

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10165180 A**

(43) Date of publication of application: **23 . 06 . 98**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12P 13/08
/(C12N 15/09 , C12R 1:15), (C12N
1/21 , C12R 1:15), (C12P 13/08 ,
C12R 1:15)

(21) Application number: **08325658**

(22) Date of filing: **05 . 12 . 96**

(71) Applicant: **AJINOMOTO CO INC**

(72) Inventor: **HAYAKAWA ATSUSHI**
SUGIMOTO MASAKAZU
YOSHIHARA YASUHIKO
NAKAMATSU WATARU

(54) PRODUCTION OF L-LYSINE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA comprising aspartokinase gene free from feed back inhibition by L-lysine, etc., and containing diaminopimelic acid decarboxylase gene and improved in L-lysine-producing ability of a coryneform bacterium.

SOLUTION: This new recombinant DNA contains a DNA sequence coding aspartokinase, in which feed back inhibition is substantially released by L-lysine and

L-threonine and a DNA sequence coding diaminopimelic acid decarboxylase and can autonomously replicate in a coryneform bacterium cell. L-Lysine producing ability and growth rate can be improved by transducing the DNA into coryneform bacterium and L-lysine can efficiently be obtained by culturing the bacterium in a suitable culture medium. The recombinant DNA is obtained by connecting a DNA sequence coding a variant aspartokinase and a DNA sequence coding diaminopimelic acid decarboxylase to a vector DNA.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-165180

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月23日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 N 15/09
C 0 7 H 21/04
C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/08
// (C 1 2 N 15/09

識別記号
Z N A
Z N A

F I
C 1 2 N 15/00
C 0 7 H 21/04
C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/08
Z N A A
B
A

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-325658

(22) 出願日 平成 8 年(1996)12月 5 日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋 1 丁目15番 1 号

(72) 発明者 早川 敦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素
株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 杉本 雅一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素
株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 吉原 康彦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素
株式会社生産技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 - 遠山 勉 (外 2 名)

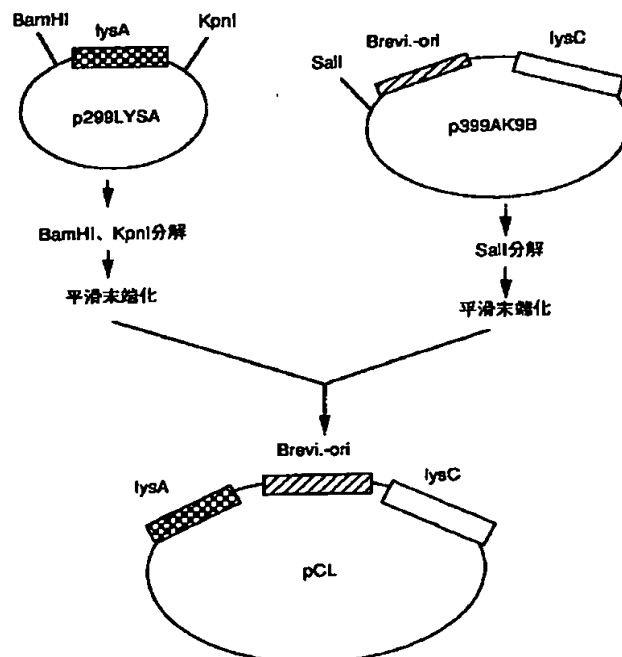
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-リジンの製造法

(57) 【要約】

【課題】 コリネ型細菌のL-リジン生産能及び生育速度を改善する。

【解決手段】 ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列、及びジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA配列が増強されたコリネ型細菌を、好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 レーリジン及びレスレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA配列と、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列とを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNA。

【請求項2】 前記レーリジン及びレスレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼが、コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼであり、 α サブユニットではN末端から279番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に、 β サブユニットでは30番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した変異型アスパルトキナーゼである請求項1記載の組換えDNA。

【請求項3】 ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列が、配列表配列番号12に示すアミノ酸配列又はこれと実質的に同一のアミノ酸配列をコードする請求項1記載の組換えDNA。

【請求項4】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列をさらに含む請求項1記載の組換えDNA。

【請求項5】 レーリジン及びレスレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼを保持し、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列が増強されたコリネ型細菌。

【請求項6】 請求項1記載の組換えDNAが導入されたことにより形質転換された請求項5記載のコリネ型細菌。

【請求項7】 さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列が増強された請求項5記載のコリネ型細菌。

【請求項8】 請求項4記載の組換えDNAが導入されたことにより形質転換された請求項7記載のコリネ型細菌。

【請求項9】 請求項6～8のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にレーリジンを生成蓄積せしめ、該培養物からレーリジンを採取することを特徴とするレーリジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリネ型細菌に遺伝子操作の手法を用いて改変を加え、該微生物を培養することによるレーリジンの製法に関する。

【0002】

【従来の技術】飼料添加物として用いられているレーリジンは通常、コリネ型細菌のレーリジン生産変異株を使って発酵法により生産されている。現在知られている種々のレーリジン生産菌はコリネ型細菌の野生株の人工変

異により作られている。一方、コリネ型細菌において、菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド（米国特許第4514502号参照）、遺伝子の菌体への導入方法（特開平2-207791号等）が開示されており、これらの技術を用いたレスレオニンまたはレーイソロイシン生産菌育成の可能性が開示されている（米国特許第4452890号、及び米国特許第4442208号参照）。また、レーリジン生産菌育成に関しても、ベクタープラスミドにレーリジン生合成に関与する遺伝子を組み込み、菌体内で増幅させる技術（特開昭56-160997号などがある）が知られている。

【0003】レーリジン生合成遺伝子としては、例えば、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子（特開平7-75578）やジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（Ishino, S. et al., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)）のように、レーリジン生合成に関与する遺伝子をクローニングした例や、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-87788）、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子（特公平6-55149）、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-62994）のように、遺伝子の増幅がレーリジン生産性に影響を与える例が知られている。

【0004】また、レーリジン生合成に関与する酵素のうち、野生型ではフィードバック阻害を受ける酵素について、フィードバック阻害が解除された変異を有する酵素遺伝子を導入してレーリジン生産性を向上させた例も知られている。このような遺伝子として具体的には、アスパルトキナーゼ遺伝子（W094/25605国際公開パンフレット）等が知られている。

【0005】上記のように、レーリジン生合成遺伝子の増幅、あるいは変異遺伝子の導入によって、一定の成果が得られている。例えば、リジン及びスレオニンによる協奏阻害が解除された変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を保持するコリネ型細菌は、レーリジンを著量（約25g/L）生産する。但し、該細菌は、変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を保持しない細菌と比較して生育速度が低下する。また、変異型アスパルトキナーゼ遺伝子に加え、さらにジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子を導入することによってレーリジン生産性が向上するとの報告（Applied and Environmental Microbiology 57(6), 1746-1752 (1991)）もある。但し、概細菌は、生育速度が一層低下する。

【0006】一方、レーリジン生合成遺伝子の増強により生育の改善が図られた例は報告されていない。また、コリネ型細菌においては、レーリジン生合成遺伝子を複数個組み合わせ、生育を抑制せずにレーリジン収率の大幅な改善に成功した例は知られていないのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点か

らなされたものであり、コリネ型細菌においてL-リジン生合成遺伝子を複数個組み合わせることで増強し、生育を抑制せずにL-リジン収率を改善することを課題とする。微生物を用いた物質の発酵生産を行なう場合、投入した原料に対する目的物質の収率と並んで、生産速度は極めて重要な因子であり、設備当りの生産速度を上げることにより目的物質を大幅に安価に製造することが出来る。そのため、発酵収率と生産速度を両立させることは工業的に極めて重要である。本発明は、コリネ型細菌を用いたL-リジンの発酵生産を行なうに当たり、以上の様な課題の解決方法を提示するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨は、コリネ型細菌において、L-リジン及びL-スレオニンによる協奏阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA配列と、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列とを併せて増強することにより、これらを単独で増強した場合と比べ、生育が改善され、L-リジン生産速度を向上させることができ、更にホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列を増強することにより、L-リジン生産速度を一層向上できることにある。

【0009】すなわち本発明は、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA配列、及びジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列を含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNAである。また、上記各DNA配列に加えてホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列をさらに含む組換えDNAを提供する。

【0010】また、本発明は、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼを保持し、さらにジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNAが増強されたコリネ型細菌を提供する。さらに、このコリネ型細菌において、さらにホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNAが増強されたコリネ型細菌を提供する。

【0011】さらに本発明は、上記のいずれかのコリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法を提供する。以下、アスパルトキナーゼを「AK」、AKをコードする遺伝子を「lysC」、L-リジン及びL-スレオニンによる協奏阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼを「変異型AK」、変異型AKをコードする遺伝子を「変異型lysC」ともいう。また、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを「DDC」、DDCをコードする遺伝子をlysA、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを「PEPC」、PEPCをコードする遺伝子を「ppc」

ともいう。

【0012】尚、本発明においてコリネ型細菌とは、バーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、コリネバクテリウム属細菌、及び従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属菌として統合されたプレバクテリウム属細菌、さらにコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明に用いられるL-リジン生合成遺伝子の取得

本発明に用いるL-リジン生合成遺伝子は、DNA供与体である細菌から染色体DNAを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーから所望の遺伝子を保持する株を選択し、選択された株からその遺伝子が挿入された組換えDNAを回収することによって得られる。本発明に用いるL-リジン生合成遺伝子のDNA供与体としては、所望のL-リジン生合成遺伝子がコリネ型細菌細胞中で機能する酵素タンパク質を発現するものであれば、特に制限されないが、コリネ型細菌が好ましい。

【0014】コリネ型細菌由来のlysC、lysA及びppc遺伝子は、いずれも配列が知られているので、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照) によって増幅することにより取得することができる。以下に、本発明に用いる各L-リジン生合成遺伝子を取得する方法を例示する。

【0015】(1) 変異型lysCの取得

変異型lysCを含むDNA断片は、AK活性に対するL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株から調製することができる (W094/25605国際公開パンフレット)。このような変異株は、例えば、コリネ型細菌野生株に、通常の変異処理法、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の変異剤処理を施し、変異処理した細胞群の中から取得することができる。AK活性の測定は、Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry (1968), 63 (2), 139-148に記載される方法を用いることができる。このような変異株として、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) 野生株ATCC13869株 (現在の名称は、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) に変更されている) より変異処理により誘導されたL-リジン生産菌AJ3445 (FERM P-1944) が最も好ましいものとして挙げられる。

【0016】また、変異型lysCは、野生型lysCを含むプラスミドDNAをインビトロ変異処理することによって得られる。さらに、AKのL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害を解除する変異が具体的に知られている(W094/25605国際公開パンフレット)ので、この情報に基づいて部位特異的変異法等により、野生型lysCから調製することもできる。

【0017】コリネ型細菌からlysCを単離するには、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta, 72, 619, (1963))等により染色体DNAを調製し、ポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al: Trends Genet. 5, 185 (1989)参照)により、lysCを増幅することによって行うことができる。

【0018】DNAプライマーとしては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列(Molecular Microbiology (1991), 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照)を基にして、lysCをコードする約1643bpの領域を増幅すべく、配列表配列番号1及び配列番号2に示す塩基配列を有する23mer及び21merの一本鎖DNAが挙げられる。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380 Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて(Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照)常法に従って合成できる。PCR反応は、宝酒造(株)製DNAサーマルサイクラーPJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0019】PCR法により増幅されたlysCは、E. coli及び/又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをE. coli細胞に導入しておくと、後の操作がしやすくなる。E. coli細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

【0020】また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片を挿入すると、E. coli及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をかつこ内に示した。

【0021】

pHC4 エシェリヒア・コリAJ12617 (FERM BP-3532)

pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882 (FERM BP-136)

コリネバクテリウム・グルタミカムASR8201 (ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883 (FERM BP-137)

コリネバクテリウム・グルタミカムASR8202 (ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884 (FERM BP-138)

pAJ3148 コリネバクテリウム・グルタミカムASR8203 (ATCC39137)

pAJ440 バチルス・ズブチスAJ11901 (FERM BP-140)

【0022】これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びSDSを用いて溶菌し、30000×gで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

10 【0023】E. coliにプラスミドを導入して形質転換するにはD. M. Morrisonの方法(Methods in Enzymology, 68, 326, 1979)あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))等により行うことができる。上記のようにしてAK野生株からlysCを単離すれば野生型lysCが得られ、AK変異株からlysCを単離すれば変異型lysCが得られる。

【0024】野生型lysCを含むDNA断片の塩基配列の一例を、配列表配列番号3に示す。この塩基配列より推定される野生型AKタンパク質のαサブユニットのアミノ酸配列をDNA配列と同時に配列表の配列番号4に、アミノ酸配列のみを配列番号5に示す。また、DNA塩基配列より推定される野生型AKタンパク質のβサブユニットのアミノ酸配列をDNAと同時に配列表の配列番号6に、アミノ酸配列のみを配列番号7に示す。尚、各サブユニットとも、開始コドンにGTGが用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。

30 【0025】本発明に用いる変異型lysCとしては、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が解除されたAKをコードするものであれば特に制限されないが、野生型AKのアミノ酸配列において、αサブユニットではN末端から279番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に、βサブユニットでは30番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化する変異が挙げられる。ここで、野生型AKのアミノ酸配列としては、具体的にはαサブユニットでは配列表配列番号5に示すアミノ酸配列が、βサブユニットでは配列表配列番号7に示すアミノ酸配列が挙げられる。

40 【0026】また、上記のアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基として好ましいものは、スレオニン残基、アルギニン残基、システイン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、チロシン残基及びバリン残基が挙げられる。尚、置換されるアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型AKのアミノ酸配列がわずかに相異なるものと予想される。このような酵素

の活性に関与しない1又は2以上の位置での1又は2以上のアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するAKも本発明に使用することができる。このような自然変異を有するAKをコードするDNAは、AKを保持する微生物細胞から、例えば配列表の配列番号3に記載の塩基配列の少なくとも一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを単離することによって、取得され得る。ここでいう

「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは温度が完全にマッチしたハイブリッドの $T_m \sim (T_m - 30)^\circ\text{C}$ 、好ましくは $T_m \sim (T_m - 20)^\circ\text{C}$ の範囲で、かつ $1 \times \text{SSC}$ 、好ましくは $0.1 \times \text{SSC}$ に相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0027】さらに、AK活性、及びL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない限り、他の1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による人工変異を有するAKも使用できる。このような人工変異を有するAKをコードするlysCは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、あるいは挿入されるように塩基配列を改変することによって得られる。また、このような変異を有するlysCは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、lysCを含むDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びlysCを含むDNAを保持する微生物を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。変異処理した後、変異処理されたDNA又は変異処理された微生物から、これらがコードし又は産生するAKがAK活性を保持し、かつ、AKのアミノ酸配列が変異したものを選択することによって、変異を導入することができる位置、又は変異が生じた位置を決定することができる。導入される変異の位置は、AK活性及びフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない限り、特に制限されない。また、導入される変異の数は、タンパク質の立体構造における変異されるアミノ酸の位置や種類によっても異なり、AK活性及びフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない限り、特に制限されないが、通常、1~20個、好ましくは1~10個である。

【0028】ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム野生型株であるAJ12036株 (FERMBP-734) に変異型lysCプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、1992

年4月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM P-12918として寄託され、1995年2月10日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERMBP-4999の受託番号で寄託されている。

【0029】(2) lysAの取得

lysAを含むDNA断片は、コリネ型細菌染色体からPCRにより調製することができる。DNA供与菌としては特に制限されないが、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株が挙げられる。コリネ型細菌においては、lysAはargS (アルギニル-tRNAシンターゼ遺伝子) とともにオペロンを形成しており、argSの下流にlysAが存在している。lysAの発現は、argSの上流にあるプロモーターによって調節を受ける (Journal of Bacteriology Nov., 7356-7362 (1993)参照)。これらの遺伝子の塩基配列は、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知であり (Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)、Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)参照)、これを基にしてPCR用DNAプライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号8 (Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)に記載されている塩基配列において塩基番号11~33に相当する) 及び配列番号9 (Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)に記載の塩基配列において塩基番号1370~1392に相当する) に示す塩基配列を有する各々23merのDNAが挙げられる。DNAの合成、PCR反応、得られたlysAを含むプラスミドの調製等は、前記のlysCの場合と同様にして行うことができる。

【0030】後記実施例では、lysAを増強するために、プロモーター、argS及びlysAを含むDNA断片を用いたが、argSは本発明に必須ではなく、lysAがプロモーターの直下に連結されたDNA断片を用いてもよい。argS及びlysAを含むDNA断片の塩基配列及びこの配列がコードすると予想されるアミノ酸配列の一例を配列番号10に示す。また、argSがコードするアミノ酸配列の一例を配列番号11に、lysAがコードするアミノ酸配列の一例を配列番号12に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするDNA断片の他、配列番号12に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちDDC活性に実質的に影響がない限り、1又は2以上の位置での1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするDNA断片も同様に使用できる。このような自然変異又は人工変異を有するlysAは、前記のAK活性、及びL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない変異を有するAKをコードするDNAと同様にして取得することができる。

【0031】(3) ppcの取得

ppcを含むDNA断片は、コリネ型細菌染色体からPCRにより調製することができる。DNA供与菌としては特に制限されないが、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株が挙げられる。ppc遺伝子は、コリネバクテリウム グルタミカムにおいて既知であり (O'Regan, M., et al., Gene, 77, 237-251 (1989))、これを基にしてPCR用プライマーを調製することができる。このようなDNAプライマーとして具体的には、配列表の配列番号13及び14に記載の塩基配列を有する各々23merのDNAが挙げられる。DNAの合成、PCR反応、得られたppcを含むプラスミドの調製等は、前記のlysCの場合と同様に行うことができる。

【0032】ppcを含むDNA断片の塩基配列及びこの配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号15に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号16に示す。本発明には、このアミノ酸配列をコードするDNA断片の他、配列番号16に示すアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列、すなわちPEPC活性に実質的に影響がない限り、1又は2以上の位置での1又は2以上のアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入等による変異を有するアミノ酸配列をコードするDNA断片も同様に使用できる。このような自然変異又は人工変異を有するppcは、前記のAK活性、及びL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害の解除に実質的に影響のない変異を有するAKをコードするDNAと同様にして取得することができる。

【0033】コリネ型細菌由来のppcは、gap (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子)、pgk (ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子)、及びtpi (トリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子)とともにオペロンを形成しており、tpiの下流にppcが存在している。ppcの発現は、pgkの上流にあるプロモーターによって調節を受ける (Schwinde, J.W. et al., J. Bacteriol., 175(12), 3905-3908 (1993)参照)。したがって、前記lysAと同様に、ppcをpgk、tpiとともにPCRにより増幅し、プロモーター、pgk、tpi及びppcを含むDNA断片を用いることができる。また、後記実施例に示すよう *

*に、PEPCのコード領域の上流に適当なプロモーターを連結したものを使用することもできる。このようなプロモーターとしては、lysCのプロモーター、E. coli由来のtacプロモーター、trcプロモーター等が挙げられる。

【0034】<2>本発明の組換えDNA及びコリネ型細菌

本発明の組換えDNAは、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA配列、及びジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列を含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNAである。本発明のDNAの好ましい態様は、上記各DNA配列に加えてホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列をさらに含む組換えDNAである。

【0035】また、本発明のコリネ型細菌は、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ (変異型AK) を保持し、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするDNA配列 (lysA) が増強されたものである。本発明のコリネ型細菌として好ましい態様は、さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA配列 (ppc) が増強されたコリネ型細菌である。ここでDNAの「増強」とは、遺伝子のコピー数を高くする、プロモーターを強力なものを使用する、比活性の高い酵素をコードする遺伝子を使用する、あるいはこれらを組み合わせるなどして、そのDNAによりコードされる酵素の細胞中の活性を高くすることをいう。

【0036】変異型AKを保持するコリネ型細菌としては、突然変異によって変異型アスパルトキナーゼを産生するようになったものでもよく、また、変異型lysCを導入することによって形質転換されたものでもよい。上記DNAを導入するコリネ型細菌の例としては、例えば次のようなL-リジン生産性野生株が挙げられる。

【0037】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC13032
(プレビバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC14020
(プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム)	ATCC13869
(コリネバクテリウム・リリウム)	ATCC15990
(プレビバクテリウム・フラバム)	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
プレビバクテリウム・サッカロリテイクム	ATCC14066
プレビバクテリウム・インマリオフィウム	ATCC14068
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

ATCC15354

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

AJ12340 (FERM BP-1539)

【0038】また、上記菌株以外にも、これらの菌株から誘導されたL-リジン生産能を有する変異株等も、宿主として利用できる。このような人工変異株としては次の様なものがある。S- (2-アミノエチル) -システイン (以下、「AEC」と略記する) 耐性変異株 (例えば、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ11082 (NRR L B-11470)、特公昭56-1914号、特公昭56-1915号、特公昭57-14157号、特公昭57-14158号、特公昭57-30474号、特公昭58-10075号、特公昭59-4993号、特公昭61-35840号、特公昭62-24074号、特公昭62-36673号、特公平5-11958号、特公平7-112437号、特公平7-112438号参照)、その成長にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株 (特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株 (米国特許第3708395号及び第3825472号)、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ- γ -グルタリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素 (デカルボキシラーゼ) または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL-リジン生産変異株 (特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号)、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株 (特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株 (特開昭55-9783号、特開昭53-86090号)、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するプレバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株 (米国特許第4411997号)。

【0039】上記のような宿主においてL-リジン生合成遺伝子を増強するには、具体的な例としては、これらの遺伝子をプラスミドベクター、トランスポゾン、ファージベクター等を用いて宿主に導入する。その際、低コピー型のベクターを用いてもある程度の増強は期待できるが、マルチコピー型のベクターを用いることが好ましい。そのようなベクターとして、上記pAJ655、pAJ1844、pAJ611、pAJ3148及びpAJ440等のプラスミドベクターが挙げられる。また、コリネ型細菌由来のトランスポゾンは、W002/02627国際公開パンフレット、W093/18151国際公開パンフレット、欧州特許公開0445385号、特開平6-46867号、Vertes, A. A. et al., Mol. Microbiol., 11, 739-746 (1994)、Bonamy, C., et al., Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994)、Vertes, A. A. et al., Mo

1. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)、Jagar, W. et al., FEMS Microbiology Letters, 126, 1-6 (1995)、特開平7-107976号、特開平7-327680号等に記載されている。

【0040】尚、本発明において、変異型lysCは必ずしも増強されている必要はなく、前記したように染色体DNA上のlysCに変異を有するもの、あるいは変異型lysCが染色体DNAに組み込まれたものでもよいが、プラスミドベクターを用いて導入されても差し支えない。一方、lysA及びppcは、効率よくL-リジンを生産させるためには増強されていることが好ましい。

【0041】lysC、lysA及びppcの各遺伝子の導入は、それぞれ別個のベクターを用いて宿主に順次導入してもよく、単一のベクターを用いて2種類又は3種類の遺伝子を共に導入してもよい。別個のベクターを用いる場合には、遺伝子の導入の順序は問わないが、宿主での安定な分配保持機構を有し、互いに共存可能なベクターを用いることが好ましい。

【0042】変異型AKを保持し、さらにlysAが増強されたコリネ型細菌は、例えば、変異型lysC、及びlysAを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNAを宿主コリネ型細菌に導入することによって、得られる。また、変異型lysC及びlysAに加え、さらに、ppcが増強されたコリネ型細菌は、例えば、変異型lysC、lysA及びppcを含み、コリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNAを宿主コリネ型細菌に導入することによって、得られる。また、変異型lysC、lysA及びppcが増強されたコリネ型細菌は、変異型lysC及びlysAが増強されたコリネ型細菌に、ppcを含みコリネ型細菌細胞中で自律増殖可能な組換えDNAを導入することによっても得られる。

【0043】上記のような組換えDNAは、例えば、プラスミドベクター、トランスポゾン、ファージベクター等のベクターに、L-リジン生合成遺伝子の各々を挿入することによって得られる。

【0044】宿主への組換えDNAの導入の方法は、プラスミドの場合、電気パルス法 (杉本ら、特開平2-207791号公報) によって行うことができる。トランスポゾンを用いた遺伝子の増幅は、プラスミドにトランスポゾンを搭載させて細胞内に導入し、トランスポゾンの転位を誘導することにより行なうことができる。

【0045】<3>L-リジンの製造法

上記のようにしてL-リジン生合成遺伝子が増強されたコリネ型細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することにより、L-リジンを効率よく製造することができる。使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通

常の培地が挙げられる。

【0046】炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜やでんぷんの加水分解物などの糖類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0047】有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガニオン等が少量添加される。培養は好氣的条件下で30~90時間実施するのがよく、培養温度は25℃~37℃に、培養中pHは5~8に制御することが好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。培養物からのL-リジンの採取は通常のイオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0048】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【実施例1】プレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生型lysC遺伝子の取得

【0049】<1>野生型及び変異型lysCの取得、及びそれらを含有するプラスミドの作製

プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株、及びATCC13869株より変異処理により得られたL-リジン生産性変異株AJ3445 (FERM P-1944) を染色体DNAの供与体として用いた。AJ3445株は、変異によりlysCがリジン及びスレオニンによる協奏阻害が実質的に解除されている (Journal of Biochemistry68, 701-710 (1970))。

【0050】染色体DNAよりPCR法 (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照) によりlysCを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5 (5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照) を基にしてlysCをコードする約1643bpの領域を増幅すべく、配列番号1及び配列番号2に示す塩基配列を有する23mer及び21merの一本鎖DNAを合成した。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成した。

【0051】PCR反応は、宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅

を行なった。増幅された1643kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI (宝酒造 (株) 製) 及びEcoRI (宝酒造 (株) 製) にて切断した。

【0052】遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpHSG399 (Takeshita, S et al; Gene (1987), 61, 63-74参照) を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI (宝酒造 (株) 製) 及び制限酵素EcoRIにて切断し、増幅されたlysC断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にプレバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体より増幅されたlysC断片が接続されたプラスミドを作製した。野生株であるATCC13869株由来のlysCを有するプラスミドをp399AKY、L-リジン生産菌であるAJ3463由来のlysCを有するプラスミドをp399AK9と命名した。

【0053】p399AKYおよびp399AK9に、それぞれコリネバクテリウム属細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片 (以下「Brevi.-ori」と記す) を導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なlysCを搭載したプラスミドを作製した。Brevi.-oriは、これを含み、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌の双方の菌体中で自律複製可能なプラスミドベクターpHK4から調製した。pHK4は、pHC4をKpnI (宝酒造 (株) 製) 及びBamHI (宝酒造 (株) 製) で切断し、Brevi.-ori断片を抽出し、同じくKpnI及びBamHIにて切断したpHSG298に接続することによって構築される (特開平5-7491号公報参照)。pHK4は、宿主にカナマイシン耐性を付与する。尚、pHK4を保持するエシェリヒア・コリHB101は、エシェリヒア・コリ AJ13136と命名され、1995年8月1日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM BP-5186として寄託されている。

【0054】pHK4を、制限酵素KpnI及びBamHIにて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー (宝酒造 (株) 製) を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi.-ori DNA断片を同じくBamHIにて切断したp399AKY、p399AK9に接続し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能でかつlysC遺伝子を含むプラスミドを作製した。

【0055】p399AKY由来の野生型lysC遺伝子を含むプラスミドをp399AKYBと命名し、p399AK9由来の変異型lysC遺伝子を含むプラスミドをp399AK9Bと命名した。p399AK9B、p399AKYB構築の過程を図1に示す。プレバクテ

リウム・ラクトファーメンタム野生株であるAJ12036株 (FERM BP-734) に変異型lysCプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、1992年4月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に受託番号FERM P-12918として寄託され、1995年2月10日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4999の受託番号で寄託されている。

【0056】<2>プレバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型lysC及び変異型lysCの塩基配列の決定 野生型lysCを含むプラスミドp399AKY及び変異型lysCを含むプラスミドp399AK9を各々の形質転換体から調製し、野生型及び変異型lysCの塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーらの方法 (F. Sanger et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977) などがある) によった。

【0057】p399AKYにコードされている野生型lysCの塩基配列を配列表の配列番号3に示す。一方、p399AK9にコードされている変異型lysCの塩基配列は野生型lysCと比べ、配列番号3において1051番目のGがAに変化しているという1塩基の変異のみを有していた。コリネバクテリウム・グルタミカムのlysCは、同一のDNA鎖に α 、 β の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていることが知られているが (Kalinowski, J et al.: Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204参照)、相同性から判断して本遺伝子も同一のDNA鎖に α 、 β の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていると考えられる。

【0058】DNA塩基配列より推定される野生型AKタンパク質の α サブユニットのアミノ酸配列をDNA配列と同時に配列表の配列番号4に、アミノ酸配列のみを配列番号5に示す。また、DNA塩基配列より推定される野生型AKタンパク質の β サブユニットのアミノ酸配列をDNAと同時に配列表の配列番号6に、アミノ酸配列のみを配列番号7に示す。尚、各サブユニットとも、開始コドンにGTGが用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。

【0059】一方、変異型lysC配列上の変異は、野生型AKタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号5、7) において、 α サブユニットでは279番目のアラニン残基がスレオニン残基に、 β サブユニットでは30番目のアラニン残基がスレオニン残基にというアミノ酸残基置換を起こしていることを意味する。

【0060】

【実施例2】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタムlysAの取得

<1>lysAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC

13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRにより、argS、lysA及びこれらを含むオペロンのプロモーターを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーとしては、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology 4(11), 1819-1830 (1990)、Molecular and General Genetics 212, 112-119 (1988)参照) を基にしてアルギニル-tRNAシンターゼ及びDDCをコードする約3.6kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号8及び9に記載の塩基配列を有する各々23merの合成DNAを用いた。DNAの合成及びPCR反応は、実施例1と同様に行なった。増幅された3579bpの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpHSG399を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI (宝酒造(株)製) にて切断し、増幅されたlysAを含むDNA断片と接続した。この様にして取得したATCC13869由来のlysAを有するプラスミドをp399LYSAと命名した。

【0061】更に、p399LYSAをKpnI (宝酒造(株)製) と BamHI (宝酒造(株)製) で切断することにより、lysAを含むDNA断片を抽出した。このDNA断片を、pHSG299をKpnIとBamHIで切断したものと連結した。得られたプラスミドをp299LYSAと命名した。p299LYSA構築の過程を図2示す。得られたp299LYSAにBrevi.-oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なlysAを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI及びBamHIで切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造(株)製) を用い、指定された方法に行なった。平滑末端化後、リン酸化済みKpnIリンカー (宝酒造(株)製) を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をKpnIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをKpnIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくKpnIにて切断したp299LYSAに接続し、コリネ型細菌中で自律複製可能でかつlysAを含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドをpLYSABと命名した。pLYSAB構築の過程を図3に示す。

【0062】<2>プレバクテリウム・ラクトファーメンタムlysAの塩基配列の決定

p299LYSAのプラスミドDNAを調製し、実施例1と同様にして塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列及びこの配列がコードすると予想されるアミノ酸配列を配列番号10に示す。また、この塩基配列のうち、argSがコードするアミノ酸配列及びlysAがコードするアミノ酸配列を、各々配列番号11及び12に示す。

【0063】

【実施例3】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタムppcの取得

<1>ppcの取得

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC 13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC138

69株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRにより、ppcをDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーとしては、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (O' Regan, M., et al., Gene, 77, 237-251 (1989)) を基にしてPEPCをコードする約3.3kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号13及び14に記載の塩基配列を有する各々23merの合成DNAを用いた。DNAの合成及びPCR反応は、実施例1と同様に行なった。

【0064】増幅された約3300bpの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素SalI (宝酒造(株)製)にて切断した。ppc遺伝子のクローン化用ベクターにはpHSG399を用いた。pHSG399を制限酵素SalI (宝酒造(株)製)にて切断し、増幅されたppcを含むDNA断片と接続した。この様にして取得したATCC13869由来のppcを有するプラスミドpPCFを得た。

【0065】<2>ppc遺伝子とlysCプロモーターとの連結

上記のようにして得られたpPCFを制限酵素DraI (宝酒造(株)製)で切断し、PEPC構造遺伝子の上流約150bpのDNA断片を削除した後、自己連結して、プラスミドpPCFsを得た。さらに、pPCFsを制限酵素SalI (宝酒造(株)製)で切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造(株)製)を用い、指定された方法にて行なった。

【0066】一方、実施例1で得た野生型lysC遺伝子を含むプラスミドp399AKYBを制限酵素ApaLI及びPstI (いずれも宝酒造(株)製)で切断し、前記と同様にして切断面を平滑末端化した。得られる2つのDNA断片のうち短い方の断片は、Brevi.-oriとlysCのプロモーター部分を含んでいる。このDNA断片と上記のpPCFsをSalIで切断後平滑末端化した断片とを、DNAライゲーションキット (宝酒造(株)製)を用いて連結した。

【0067】ライゲーション反応液中のDNAを、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869に電気パルス法 (杉本ら、特開平2-207791号公報)にて導入した。形質転換体の選択は、クロラムフェニコール5μg/mlを含む完全培地にて行なった。形質転換体よりプラスミドDNAを回収し、EcoRIで切断し、lysCプロモーターとppc構造遺伝子が順方向に連結したプラスミドを取得した。このプラスミドをpAKPFdsと命名した。pAKPFds構築の過程を図4に示す。以下、このlysCプロモーターが連結したppcを、「野生型高発現型ppc」という。

【0068】<3>野生型高発現型ppcのベクターへの挿入

上記で得られた野生型高発現型ppcを、Brevi.-ori以外のコリネ細菌細胞中で自律増殖可能な複製開始点を有するベクターに挿入するために、PCR法によって増幅し

た。プライマーには、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっているlysCの塩基配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324参照) を基にして合成したlysCプロモーター部分に対応するオリゴヌクレオチド (配列番号17)、及びコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっているppcの配列 (O' Regan, M., et al., Gene, 77, 237-251 (1989)) を基にして合成したppc部分に対応するオリゴヌクレオチド (配列番号18) を用いた。これらのプライマーは、野生型高発現型ppcを含む約3150bpの断片を増幅することができ、増幅されたDNA断片の末端を制限酵素KpnIによって切断できるように設計されている。DNAの合成及びPCR反応は、実施例1と同様に行なった。

【0069】野生型高発現型ppcをコリネ型細菌型細菌に導入するためのベクターには、新規に構築したコリネ型細菌用クローニングベクターpVK7を用いた。pVK7は、以下のようにして、E. coli用ベクターであるpHSG299 (Km^r; Takeshita, S. et al., Gene, 61, 63-74, (1987)参照) にプレバクテリウム・ラクトファーマンタムのクリプティックプラスミドであるpAM330を結合することによって構築した。pHSG299を一箇所切断酵素であるAvaII (宝酒造(株)製)にて切断し、T4DNAポリメラーゼにて平滑末端化したのち、HindIII (宝酒造(株)製)にて切断し、T4DNAポリメラーゼにて平滑末端化したpAM330と接続した。pHSG299に対するpAM330の挿入方向により、生成した2種類のプラスミドをpVK6、pVK7と命名し、pVK7を以下の実験に用いた。pVK7は、E. coli及びプレバクテリウム・ラクトファーマンタムの細胞中で自律複製可能であり、かつ、pHSG299由来のマルチプルクローニングサイトとlacZ'を保持している。pVK6及びpVK7の構築の過程を図5に示す。

【0070】前記のPCRによって増幅された野生型高発現型ppcを含む約3150bpの断片を、アガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素KpnI (宝酒造(株)製)にて切断した。このDNA断片を、制限酵素KpnIにて切断したpVK7と接続した。このプラスミドをpPwmと命名した。pPwm構築の過程を図6に示す。

【0071】

【実施例4】変異型lysC及びlysAを併せ持つプラスミドの作製変異型lysC及びBrevi.-oriを有するプラスミドp399AK9Bと、lysAを有するプラスミドp299LYSAより、変異型lysC、lysAおよびコリネ細菌の複製起点を有するプラスミドを作製した。p299LYSAを制限酵素BamHI (宝酒造(株)製)とKpnI (宝酒造(株)製)で切断した後、平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造(株)製)を用い、指定された方法にて行なった。このDNA断片を、p399AK9BをSalIで切断した後平滑末端化したものと接続した。こうして、変異型lysC及びlysAを

有し、コリネ型細菌中で自律増殖可能なプラスミドを作製し、pCLと命名した。pCLの作製過程を図7に示す。

【0072】

【比較例1】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタムdapA、dapB、ddhの取得

lysC、lysA及びppc以外のL-リジン生合成遺伝子として、dapA（ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子）、dapB（ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子）、ddh（ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子）を、以下のようにして取得した。

【0073】<1>プレバクテリウム・ラクトファーメンタムdapAの取得及びそれを含有するプラスミドの作製

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC 13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRによりdapAを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列（Nucleic Acids Research 18(21), 6421 (1990)、EMBL accession No. X5 3993参照）を基にしてDDPSをコードする約1.5kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号19及び20に記載の塩基配列を有する各々23merのDNAを合成した。DNAの合成及びPCR反応は、実施例1と同様に行なった。増幅された1411bpの遺伝子断片のクローン化用のベクターにはpCR1000（Invitrogen社製；Bio/Technology 9, 657-663 (1991)参照）を用い、増幅したdapA断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpCR1000にプレバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたdapA断片1411bpの接続されたプラスミドを作製した。この様にして取得したATCC13869由来のdapAを有するプラスミドをpCRDAPAと命名した。

【0074】E. coli JM109株にpCRDAPAを導入して得られた形質転換株AJ13106株は、1995年5月26日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM BP-5113の受託番号で、ブダベスト条約に基づき国際寄託されている。作製したpCRDAPAにBrevi. -oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なdapAを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI及びBamHI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みSmaIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi. -ori部分のDNA断片をSmaIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをSmaIにより切断し、生じたBrevi. -oriDNA断片を同じくSmaIにて切断したpCRDAPAに接続し、コリ

ネ型細菌中で自律増殖可能でかつdapAを含むプラスミドを作製した。このプラスミドをpDPSBと命名した。pDPSB（Km^r）の構築過程を図8に示す。

【0075】<2>プレバクテリウム・ラクトファーメンタムdapBの取得及びそれを含有するプラスミドの作製

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株ATCC 13869株を染色体DNAの供与体として用いた。ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCRによりdapBを含むDNA断片を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはプレバクテリウム・ラクトファーメンタムにおいて既知となっている配列（Journal of Bacteriology 175(9), 2743-2749 (1993)参照）を基にしてDDPRをコードする約2.0kbの領域を増幅すべく、配列表の配列番号21及び22に記載の塩基配列を有する各々23merのDNA断片を合成した。DNAの合成及びPCR反応は、実施例1と同様に行なった。増幅された2001bpの遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpCR-Script（Invitrogen社製）を用い、増幅したdapB断片と接続した。この様にしてpCR-Scriptにプレバクテリウム・ラクトファーメンタム染色体より増幅されたdapB断片2001bpの接続されたプラスミドを作製した。この様にして取得したATCC13869由来のdapBを有するプラスミドをpCRDAPBと命名した。E. coli JM109株にpCRDAPBを導入して得られた形質転換株AJ13107株は、1995年5月26日より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM BP-5114の受託番号で、ブダベスト条約に基づき国際寄託されている。

【0076】更に、pCRDAPBをEcoRVとSphIで切断する事により、DDPRの構造遺伝子を含む1101bpの断片を抽出した。この断片を、pHSG399をHincIIおよびSphIにて切断したものと連結したプラスミドを作成した。この作成したプラスミドをp399DPRと命名した。

【0077】作製したp399DPRにBrevi. -oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なdapBを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりBrevi. -ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi. -oriDNA断片を同じくBamHIにて切断したp399DPRに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつdapBを含むプラスミドを作製した。作製したプラスミドをpDPRBと命名した。pDPRB構築の過程を図9に示す。

【0078】<3>プレバクテリウム・ラクトファー

メンタムddhの取得及びそれを含有するプラスミドの作製

ddh遺伝子は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Cornebacterium glutamicum*) のddh遺伝子の既知のヌクレオチド配列 (Ishino, S. et al., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1987)) をもとに作成した2種のオリゴヌクレオチドプライマー (配列番号23、24) を用いたPCR法により、ブレバクテリウム ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体DNAからddh遺伝子を増幅することによって得た。得られた増幅DNA断片をEcoT22 IとAvaIで切断し、末端を平滑化した後、pMW119のSmaI部位に挿入し、プラスミドpDDHを得た。

【0079】次に、pDDHをSalIとEcoRIにて切断し、平滑末端化した後、得られた断片をSmaIで切断したpUC18と連結した。こうして得られたプラスミドをpUC18DDHと命名した。pUC18DDHにBrevi.-oriを導入し、コリネ型細菌中で自律複製可能なddhを搭載したプラスミドを作製した。pHK4を制限酵素KpnI及びBamHIで切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みPstIリンカー (宝酒造 (株) 製) を接続し、pHSG299のPstI部位に挿入した。このようにして作製したプラスミドをpPK4と命名した。次に、pUC18DDHをXbaIとKpnIで切断し、生じたddh断片をKpnIとXbaIで切断したpPK4に接続した。このようにして、コリネ型細菌中で自律複製可能で、かつ、ddhを含むプラスミドを作製し、このプラスミドをpPK4Dと命名した。pPK4D構築の過程を図10に示す。

【0080】

【比較例2】 変異型lysCと、dapA、dapB又はddhとを併せ持つプラスミドの作製

<1>変異型lysC及びdapAを併せ持つプラスミドの作製
dapAを有するプラスミドpCRDAPAと変異型lysC及びBrevi.-oriを有するプラスミドp399AK9Bより、変異型lysC、dapAおよびコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドを作製した。p399AK9BをSalIにて完全分解した後、平滑末端化し、EcoRIリンカーを接続する事によりSalI部位をEcoRI部位に改変したプラスミドを作製した。得られたプラスミドをp399AK9BSEと命名した。p399AK9BSEをEcoRIにて部分分解することによって変異型lysCとBrevi.-oriを一つのフラグメントとして切り出した。このフラグメントをpCRDAPAをEcoRIにて切断したものと連結した。得られたプラスミドをpCRCABと命名した。このプラスミドはE. coliとコリネ型細菌中で自律増殖可能で、かつ宿主にカナマイシン耐性を付与し、変異型lysCとdapAを併せ保持しているプラスミドである。pCRCABの作製過程を図11に示す。

【0081】<2>変異型lysC及びdapBを併せ持つプラスミドの作製

変異型lysCを有するプラスミドp399AK9とdapBを有する

プラスミドp399DPRより、変異型lysC、dapBを含むプラスミドを作製した。p399DPRをEcoRVとSphIで切断することにより、DDPRの構造遺伝子を含む1101bpの断片を抽出した。この断片を、p399AK9をSalIで切断した後平滑末端化し、更にSphIにて切断したものと結合し、変異型lysCとdapBを併せ持つプラスミドを作製した。このプラスミドをp399AKDDPRと命名した。

【0082】次に、得られたp399AKDDPRにBrevi.-oriを導入した。Brevi.-oriを含むプラスミドpHK4を制限酵素KpnI (宝酒造 (株) 製) にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー (宝酒造 (株) 製) を接続し、pHK4よりBrevi.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたBrevi.-oriDNA断片を同じくBamHIにて切断したp399AKDDPRに接続し、コリネ型細菌中で自律増殖可能でかつ変異型lysCおよびdapBを含むプラスミドを作製し、pCBと命名した。pCBの構築の過程を図12に示す。

【0083】<3>変異型lysC及びddhを併せ持つプラスミドの作製

ddhを含むプラスミドpUC18DDHと変異型lysC及びBrevi.-oriを有するプラスミドp399AK9Bより、変異型lysC、ddhおよびコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドを作製した。pUC18DDHを制限酵素EcoRI (宝酒造 (株) 製) にて切断し、平滑末端化し、この末端にSalIポリリンカーを接続し、EcoRI部位をSalI部位に改変した。このプラスミドをSalIで切断し、ddhを含むDNA断片を取得した。

【0084】次に、p399AK9Bを制限酵素SalIで切断し、上記ddhを含むDNA断片と接続した。こうして、変異型lysC、ddh及びBrevi.-oriを有し、コリネ型細菌中で自律増殖可能なプラスミドを作製し、pCDと命名した。pCDの構築の過程を図13に示す。

【0085】

【実施例5】 L-リジン生合成遺伝子を含むプラスミドのブレバクテリウム・ラクトファーマンタムL-リジン生産菌への導入

上記のようにして作製されたL-リジン生合成遺伝子を有するプラスミドp399AK9B (Cm^r)、pLYSAB (Cm^r)、pPwm (Km^r)、pCRCAB (Km^r)、pCB (Cm^r)、pCD (Cm^r)、pCL (Cm^r) をブレバクテリウム・ラクトファーマンタムL-リジン生産菌であるAJ11082 (NRR LB-11470) に導入した。AJ11082株は、AEC耐性の性質を有する。プラスミドの導入の方法は、電気パルス法 (杉本ら、特開平2-207791号公報) によった。形質転換体の選択は各々のプラスミドが持つ薬剤耐性マーカーによった。クロラムフェニコール耐性遺伝子を有するプラスミドを導入した場合は5 µg/mlのクロラ

ムフェニコールを含む完全培地にて、また、カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドを導入した場合には25 μ g/mlのカナマイシンを含む完全培地にて形質転換体の選択を行なった。

【0086】得られた形質転換体のうち、変異型lysC及びlysAが増強された株(AJ11082/pCL)にpPwm(Km^r)を導入して、変異型lysC、lysA及びppcの3者が増強された株(AJ11082/pCL/pPwm)を得た。形質転換体の選択は、5 μ g/mlのクロラムフェニコールと25 μ g/mlのカナマイシンを含む完全培地にて行なった。

【0087】

【実施例6】 L-リジンの製造

実施例5で取得した各形質転換体をL-リジン生産培地にて培養し、そのL-リジン生産能を評価した。L-リジン生産培地の組成は以下に示す通りである。

【0088】 [L-リジン生産培地] 炭酸カルシウム以外の下記成分(1L中)を溶解し、KOHでpH8.0に調製し、115℃で15分殺菌した後、別に乾熱殺菌した炭酸カルシウムを50g加える。

*

表1 培養時間40、72時間後のL-リジン蓄積

菌株/プラスミド	導入遺伝子	L-リジン生産量(g/L)	
		40時間後	72時間後
AJ11082		22.0	29.8
AJ11082/p399AK9B	lysC ^r	16.8	34.5
AJ11082/pLYSAB	lysA	19.8	32.5
AJ11082/pPwm	ppc	20.7	28.9
AJ11082/pCRCAB	lysC ^r , dapA	19.7	36.5
AJ11082/pCB	lysC ^r , dapB	23.3	35.0
AJ11082/pCD	lysC ^r , ddh	15.0	27.0
AJ11082/pCL	lysC ^r , lysA	24.0	44.0
AJ11082/pCL/pPwm	lysC ^r , lysA, ppc	25.0	45.2

【0092】以上に示すように、変異型lysC、lysA又はppcを単独で増強した場合、及び変異型lysCと、dapA又はddhのいずれかとを組み合わせ増強した場合には、培養72時間後にはL-リジン生産量は親株よりも多いか同程度であるが、40時間後では親株よりも生産量が少なく、すなわち短期間培養におけるL-リジン生産速度は低下した。特に、変異型lysCとddhとを組み合わせ増強した場合には、培養40時間後、72時間後ともに親株よりもL-リジン生産量が低下した。これに対し、変異型lysCとともにdapBを増強した株では、生育が改善され、短期間培養におけるL-リジン生産速度を回復させることができ、長期間培養でのL-リジン蓄積量も増加した。

【0093】一方、lysCとlysAを組み合わせ増強した場合には、短期間培養におけるL-リジン生産速度が親株に比べて向上した上、長期間培養でのL-リジン蓄

* 【0089】

グルコース	100 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
ビオチン	500 μ g
チアミン	2000 μ g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
ニコチンアミド	5 mg
蛋白質加水分解物(豆濃)	30 ml
炭酸カルシウム	50 g

【0090】上記組成の培地に各種形質転換体及び親株を植菌し、31.5℃にて往復振盪培養を行った。培養40時間、72時間後のL-リジン生成量を表に示す。表中、lysC^rは変異型lysCを表す。

【0091】

【表1】

積量も飛躍的に向上した。さらに、変異型lysC、lysA及びppcの3者が増強された株では、L-リジン生産性が一層向上された。

【0094】

【発明の効果】本発明により、コリネ型細菌のL-リジン生産量及びL-リジン生産速度を向上させることができる。

【0095】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: NO

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT

23

【0096】配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

*

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C

21

【0097】配列番号：3

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：GenomicDNA

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

10

※ 株名：ATCC 13869

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAT TCGAATATCA ATATACGGTC 60
 TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT 120
 GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180
 GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTGGT ACAGAAATAT 240
 GGGCGTTTCT CGCTTGAGAG TGGCGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC 300
 ACCAAGAAGG CTGGAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360
 GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420
 CTCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT 480
 GGGCAGAAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC 540
 GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GTCGTGTGCG GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600
 AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCAACACG 660
 TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGGCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT 720
 GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT 780
 AATGCACAGA AGCTGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAATTGCG TGCTGTTGGC 840
 TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC 900
 GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT 960
 CCTGTGGAAG AAGCAGTCTT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC 1020
 GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT 1080
 GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC 1140
 GACATCACGT TCACCTGCCC TCGCGCTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG 1200
 CTTCAAGTTC AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTGCG CAAAGTCTCC 1260
 CTGCTGGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG 1320
 CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG 1380
 ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCAATTG ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC 1440
 GGCGAAGACG AAGCCGTGCT TTATGCAGGC ACCGGAACGT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT 1500
 TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGTTGG CAACCGGCCA GGTCCGCCAG GTTATGCGCA 1560
 CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCGCGTT 1620
 CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

【0098】配列番号：4

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：GenomicDNA

起源

★生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名：ATCC 13869

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：217..1482

★

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAT TCGAATATCA ATATACGGTC 60
 TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT 120

27	GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	28	180
	GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG		234
		Met Ala Leu Val Val Gln	
		1 5	
	AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC		282
	Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val		
	10 15 20		
	GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT		330
	Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val		
	25 30 35		
	GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA		378
	Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala		
	40 45 50		
	GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG		426
	Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu		
	55 60 65 70		
	ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG		474
	Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu		
	75 80 85		
	TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG		522
	Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val		
	90 95 100		
	CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG		570
	Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro		
	105 110 115		
	GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT		618
	Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala		
	120 125 130		
	GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT		666
	Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly		
	135 140 145 150		
	CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC		714
	Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn		
	155 160 165		
	GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT		762
	Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala		
	170 175 180		
	GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC		810
	Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe		
	185 190 195		
	GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG		858
	Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu		
	200 205 210		
	CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC		906
	Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg		
	215 220 225 230		
	TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG		954
	Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu		
	235 240 245		
	GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG		1002

29	30	
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys		
250	255	260
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG		1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu		
265	270	275
GCT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC		1098
Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp		
280	285	290
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC		1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile		
295	300	305
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG		1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu		
315	320	325
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC		1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp		
330	335	340
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA		1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro		
345	350	355
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC		1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn		
360	365	370
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT		1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg		
375	380	385
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG		1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln		
395	400	405
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA		1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg		
410	415	420
AGTTTAAAG GAGTAGTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG		1542
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTGGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTCGTT		1602
TCTTTGCTTC CCCGCGTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C		1643

【0099】配列番号：5

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：421

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala	
1	15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala	
20	30
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp	
35	45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg	
50	60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu	
65	80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Glu Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr	

31 85 90 95 32
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【0100】配列番号：6

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：GenomicDNA

起源

* 生物名：ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)

株名：ATCC 13869

配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：964..1482

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCGTG	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAACCTCTAG AACTTGACG GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTGCTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTACCCAC CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCCTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACCTGC TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTT TGGTGTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008
Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu	
1 5 10 15	
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala	
20 25 30	
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val	
35 40 45	
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe	
50 55 60	
ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys	
65 70 75	
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val	
80 85 90 95	
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val	
100 105 110	
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
115 120 125	
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
130 135 140	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
145 150 155	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA	1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
160 165 170	

35 36
 AGGACTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG 1550
 GTTATGCGCA CCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT 1610
 TCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

【0101】配列番号：7

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：172

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列

Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys
 20 25 30
 Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu
 35 40 45
 Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr
 50 55 60
 Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu
 65 70 75 80
 Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly
 85 90 95
 Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr
 100 105 110
 Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu
 115 120 125
 Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp
 130 135 140
 Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly
 145 150 155 160
 Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
 165 170

【0102】配列番号：8

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：23

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

アンチセンス：NO

鎖の数：一本鎖

※

配列

GTGGAGCCGA CCATTCGGG AGG

23

【0103】配列番号：9

★ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：23

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

アンチセンス：YES

鎖の数：一本鎖

★

配列

CCAAAACCGC CCTCCACGGC GAA

23

【0104】配列番号：10

☆ ctofermentum)

配列の長さ：3579

株名：ATCC 13869

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：二本鎖

特徴を表わす記号：CDS

トポロジー：直鎖状

存在位置：533..2182

配列の種類：GenomicDNA

特徴を表わす記号：CDS

起源

存在位置：2188..3522

生物名：ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム(Brevibacterium la☆

配列

50

37	38
GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGGCTGCACT GCAACGAGGT CGTAGTTTGT GTACATGGCT	60
TCTGGCCAGT TCATGGATTG GCTGCCGAAG AAGCTATAGG CATCGCACCA GGGCCACCGA	120
GTTACCGAAG ATGGTGCCGT GCTTTTCGCC TTGGGCAGGG ACCTTGACAA AGCCCAAGCT	180
GATATCGCCA AGTGAGGGAT CAGAATAGTG CATGGGCACG TCGATGCTGC CACATTGAGC	240
GGAGGCAATA TCTACCTGAG GTGGGCATTC TTCCCAGCGG ATGTTTCTT GCGCTGCTGC	300
AGTGGGCATT GATACCAAAA AGGGGCTAAG CGCAGTCGAG GCGGCAAGAA CTGCTACTAC	360
CCTTTTATT GTCGAACGGG GCATTACGGC TCCAAGGACG TTTGTTTCT GGTGCTGTTA	420
CCCCAAAAG CATATACAGA GACCAATGAT TTTTCATTAA AAAGGCAGGG ATTTGTTATA	480
AGTATGGGTC GTATTCTGTG CGACGGGTGT ACCTCGGCTA GAATTTCTCC CC ATG	535
	Met
	1
ACA CCA GCT GAT CTC GCA ACA TTG ATT AAA GAG ACC GCG GTA GAG GTT	583
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu Val	
5 10 15	
TTG ACC TCC CGC GAG CTC GAT ACT TCT GTT CTT CCG GAG CAG GTA GTT	631
Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val Val	
20 25 30	
GTG GAG CGT CCG CGT AAC CCA GAG CAC GGC GAT TAC GCC ACC AAC ATT	679
Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn Ile	
35 40 45	
GCA TTG CAG GTG GCT AAA AAG GTC GGT CAG AAC CCT CGG GAT TTG GCT	727
Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu Ala	
50 55 60 65	
ACC TGG CTG GCA GAG GCA TTG GCT GCA GAT GAC GCC ATT GAT TCT GCT	775
Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser Ala	
70 75 80	
GAA ATT GCT GGC CCA GGC TTT TTG AAC ATT CGC CTT GCT GCA GCA GCA	823
Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala Ala	
85 90 95	
CAG GGT GAA ATT GTG GCC AAG ATT CTG GCA CAG GGC GAG ACT TTC GGA	871
Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe Gly	
100 105 110	
AAC TCC GAT CAC CTT TCC CAC TTG GAC GTG AAC CTC GAG TTC GTT TCT	919
Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val Ser	
115 120 125	
GCA AAC CCA ACC GGA CCT ATT CAC CTT GGC GGA ACC CGC TGG GCT GCC	967
Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala Ala	
130 135 140 145	
GTG GGT GAC TCT TTG GGT CGT GTG CTG GAG GCT TCC GGC GCG AAA GTG	1015
Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys Val	
150 155 160	
ACC CGC GAA TAC TAC TTC AAC GAT CAC GGT CGC CAG ATC GAT CGT TTC	1063
Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg Phe	
165 170 175	
GCT TTG TCC CTT CTT GCA GCG GCG AAG GGC GAG CCA ACG CCA GAA GAC	1111
Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu Asp	
180 185 190	
GGT TAT GGC GGC GAA TAC ATT AAG GAA ATT GCG GAG GCA ATC GTC GAA	1159
Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val Glu	
195 200 50 205	

39	40
AAG CAT CCT GAA GCG TTG GCT TTG GAG CCT GCC GCA ACC CAG GAG CTT	1207
Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu Leu	
210 215 220 225	
TTC CGC GCT GAA GGC GTG GAG ATG ATG TTC GAG CAC ATC AAA TCT TCC	1255
Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser Ser	
230 235 240	
CTG CAT GAG TTC GGC ACC GAT TTC GAT GTC TAC TAC CAC GAG AAC TCC	1303
Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn Ser	
245 250 255	
CTG TTC GAG TCC GGT GCG GTG GAC AAG GCC GTG CAG GTG CTG AAG GAC	1351
Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys Asp	
260 265 270	
AAC GGC AAC CTG TAC GAA AAC GAG GGC GCT TGG TGG CTG CGT TCC ACC	1399
Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser Thr	
275 280 285	
GAA TTC GGC GAT GAC AAA GAC CGC GTG GTG ATC AAG TCT GAC GGC GAC	1447
Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly Asp	
290 295 300 305	
GCA GCC TAC ATC GCT GGC GAT ATC GCG TAC GTG GCT GAT AAG TTC TCC	1495
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe Ser	
310 315 320	
CGC GGA CAC AAC CTA AAC ATC TAC ATG TTG GGT GCT GAC CAC CAT GGT	1543
Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His Gly	
325 330 335	
TAC ATC GCG CGC CTG AAG GCA GCG GCG GCG GCA CTT GGC TAC AAG CCA	1591
Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Pro	
340 345 350	
GAA GGC GTT GAA GTC CTG ATT GGC CAG ATG GTG AAC CTG CTT CGC GAC	1639
Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg Asp	
355 360 365	
GGC AAG GCA GTG CGT ATG TCC AAG CGT GCA GGC ACC GTG GTC ACC CTA	1687
Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr Leu	
370 375 380 385	
GAT GAC CTC GTT GAA GCA ATC GGC ATC GAT GCG GCG CGT TAC TCC CTG	1735
Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser Leu	
390 395 400	
ATC CGT TCC TCC GTG GAT TCT TCC CTG GAT ATC GAT CTC GGC CTG TGG	1783
Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu Trp	
405 410 415	
GAA TCC CAG TCC TCC GAC AAC CCT GTG TAC TAC GTG CAG TAC GGA CAC	1831
Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly His	
420 425 430	
GCT CGT CTG TGC TCC ATC GCG CGC AAG GCA GAG ACC TTG GGT GTC ACC	1879
Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val Thr	
435 440 445	
GAG GAA GGC GCA GAC CTA TCT CTA CTG ACC CAC GAC CGC GAA GGC GAT	1927
Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly Asp	
450 455 460 465	
CTC ATC CGC ACA CTC GGA GAG TTC CCA GCA GTG GTG AAG GCT GCC GCT	1975
Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Ala Val Val Lys Ala Ala Ala	

41		42
	470	480
GAC CTA CGT GAA CCA CAC CGC ATT GCC CGC TAT GCT GAG GAA TTA GCT		2023
Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu Ala		
485	490	495
GGA ACT TTC CAC CGC TTC TAC GAT TCC TGC CAC ATC CTT CCA AAG GTT		2071
Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys Val		
500	505	510
GAT GAG GAT ACG GCA CCA ATC CAC ACA GCA CGT CTG GCA CTT GCA GCA		2119
Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala Ala		
515	520	525
GCA ACC CGC CAG ACC CTC GCT AAC GCC CTG CAC CTG GTT GGC GTT TCC		2167
Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val Ser		
530	535	540
GCA CCG GAG AAG ATG TAACA ATG GCT ACA GTT GAA AAT TTC AAT GAA		2214
Ala Pro Glu Lys Met Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu		
550	1	5
CTT CCC GCA CAC GTA TGG CCA CGC AAT GCC GTG CGC CAA GAA GAC GGC		2262
Leu Pro Ala His Val Trp Pro Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly		
10	15	20
GTT GTC ACC GTC GCT GGT GTG CCT CTG CCT GAC CTC GCT GAA GAA TAC		2310
Val Val Thr Val Ala Gly Val Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr		
30	35	40
GGA ACC CCA CTG TTC GTA GTC GAC GAG GAC GAT TTC CGT TCC CGC TGT		2358
Gly Thr Pro Leu Phe Val Val Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys		
45	50	55
CGC GAC ATG GCT ACC GCA TTC GGT GGA CCA GGC AAT GTG CAC TAC GCA		2406
Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala		
60	65	70
TCT AAA GCG TTC CTG ACC AAG ACC ATT GCA CGT TGG GTT GAT GAA GAG		2454
Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu		
75	80	85
GGG CTG GCA CTG GAC ATT GCA TCC ATC AAC GAA CTG GGC ATT GCC CTG		2502
Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu		
90	95	100
GCC GCT GGT TTC CCC GCC AGC CGT ATC ACC GCG CAC GGC AAC AAC AAA		2550
Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys		
110	115	120
GGC GTA GAG TTC CTG CGC GCG TTG GTT CAA AAC GGT GTG GGA CAC GTG		2598
Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val		
125	130	135
GTG CTG GAC TCC GCA CAG GAA CTA GAA CTG TTG GAT TAC GTT GCC GCT		2646
Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala		
140	145	150
GGT GAA GGC AAG ATT CAG GAC GTG TTG ATC CGC GTA AAG CCA GGC ATC		2694
Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile		
155	160	165
GAA GCA CAC ACC CAC GAG TTC ATC GCC ACT AGC CAC GAA GAC CAG AAG		2742
Glu Ala His Thr His Glu Phe Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys		
170	175	180
TTC GGA TTC TCC CTG GCA TCC GGT TCC GCA TTC GAA GCA GCA AAA GCC		2790

43	44
Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala	
190	195 200
GCC AAC AAC GCA GAA AAC CTG AAC CTG GTT GGC CTG CAC TGC CAC GTT	2838
Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val	
205	210 215
GGT TCC CAG GTG TTC GAC GCC GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA CGC	2886
Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg	
220	225 230
GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GCC CTT	2934
Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu	
235	240 245
CCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC GGA TAC GGC ATT GCC TAT ACC GCA GCT	2982
Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala	
250	255 260 265
GAA GAA CCA CTC AAC GTC GCA GAA GTT GCC TCC GAC CTG CTC ACC GCA	3030
Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala	
270	275 280
GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA CTA GGC ATC GAC GCA CCA ACC GTG CTT	3078
Val Gly Lys Met Ala Ala Glu Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu	
285	290 295
GTT GAG CCC GGC CGC GCT ATC GCA GGC CCC TCC ACC GTG ACC ATC TAC	3126
Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr	
300	305 310
GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC CGC	3174
Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg	
315	320 325
CGT TAC ATC GCC GTG GAC GGA GGC ATG TCC GAC AAC ATC CGC CCA GCA	3222
Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala	
330	335 340 345
CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GCC GAA	3270
Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu	
350	355 360
GGA GAC CCA GTA AGC ACC CGC ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC	3318
Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly	
365	370 375
GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC	3366
Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly	
380	385 390
GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC	3414
Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser	
395	400 405
TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT	3462
Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala	
410	415 420 425
GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG CGC CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC	3510
Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu	
430	435 440
TCA CTA GAG GCA TAACGCTTTT CGACGCTGA CCCC GCCCTT CACCTTCGCC	3562
Ser Leu Glu Ala	

45

46

GTGGAGGGCG GTTTTGG

3579

【0105】配列番号:11

* トポロジー:直鎖状

配列の長さ:550

配列の種類:タンパク質

配列の型:アミノ酸

*

配列

```

Met Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu
  1           5           10           15
Val Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val
          20           25           30
Val Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn
          35           40           45
Ile Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu
          50           55           60
Ala Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser
          65           70           75           80
Ala Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala
          85           90           95
Ala Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe
          100          105          110
Gly Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val
          115          120          125
Ser Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala
          130          135          140
Ala Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys
          145          150          155          160
Val Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg
          165          170          175
Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu
          180          185          190
Asp Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val
          195          200          205
Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
          210          215          220
Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
          225          230          235          240
Ser Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn
          245          250          255
Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys
          260          265          270
Asp Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser
          275          280          285
Thr Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly
          290          295          300
Asp Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe
          305          310          315          320
Ser Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His
          325          330          335
Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys
          340          345          350
Pro Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Glu Gln Met Val Asn Leu Leu Arg

```

47 355 360 365 48
 Asp Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr
 370 375 380
 Leu Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser
 385 390 395 400
 Leu Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu
 405 410 415
 Trp Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly
 420 425 430
 His Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val
 435 440 445
 Thr Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly
 450 455 460
 Asp Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala
 465 470 475 480
 Ala Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu
 485 490 495
 Ala Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys
 500 505 510
 Val Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala
 515 520 525
 Ala Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val
 530 535 540
 Ser Ala Pro Glu Lys Met
 545 550

【0106】配列番号：12

配列の長さ：445

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列

Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
 1 5 10 15
 Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
 20 25 30
 Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
 35 40 45
 Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
 50 55 60
 Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
 65 70 75 80
 Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
 85 90 95
 Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
 100 105 110
 Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala
 115 120 125
 Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
 130 135 140
 Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe

49 165 170 175 50

Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195 200 205
 Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210 215 220
 Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260 265 270
 Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu
 275 280 285
 Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile
 290 295 300
 Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly
 325 330 335
 Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp
 340 345 350
 Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg
 355 360 365
 Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu
 370 375 380
 Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr
 405 410 415
 Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420 425 430
 Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435 440 445

【0107】配列番号:13

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

* トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:NO

*

配列

TCGTCGGTCA GCCTGACGTC GAC

23

【0108】配列番号:14

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

※ トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

※

配列

TCTTGGTGTGCGAAAGTGCACACC

23

【0109】配列番号:15

配列の長さ:3533

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

50 配列の種類:GenomicDNA

起源

生物名：ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)

株名：ATCC 13869

* 配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：321..3077

*

配列

```

GGTGGTTCTG TTAAGGCAGA AACCGTCGCT GAGATCGTCG GTCAGCCTGA CGTCGACGGC   60
GGACTTGTCG GTGGCGCTTC CCTCGACGGT GAAGCATTCG CCAAGCTGGC TGCCAACGCT   120
GCGAGCGTTG CTAAAGTAC AGAGCTTTAA AGCACAGCCT TAAAGCACAG CCTTAAAGCA   180
CAAGCACTGT AGAAGTGGG TTTTGATGAG CCCATGAAAG CCATCGAAAT CAATCGCCCA   240
GCTAAACACC TGTTTGCTG GGTGATTTT TATCTCATGC ACGCCAACAC CCTCAATGTG   300
AAAGAGTGTT TAAAGTAGTT ATG ACT GAT TTT TTA CGC GAT GAC ATC AGG   350
          Met Thr Asp Phe Leu Arg Asp Asp Ile Arg
                1             5             10
TTC CTC GGT CAA ATC CTC GGT GAG GTA ATT GCG GAA CAA GAA GGC CAG   398
Phe Leu Gly Gln Ile Leu Gly Glu Val Ile Ala Glu Gln Glu Gly Gln
                15             20             25
GAG GTT TAT GAA CTG GTC GAA CAA GCG CGC CTG ACT TCT TTT GAT ATC   446
Glu Val Tyr Glu Leu Val Glu Gln Ala Arg Leu Thr Ser Phe Asp Ile
                30             35             40
GCC AAG GGC AAC GCC GAA ATG GAT AGC CTG GTT CAG GTT TTC GAC GGC   494
Ala Lys Gly Asn Ala Glu Met Asp Ser Leu Val Gln Val Phe Asp Gly
                45             50             55
ATT ACT CCA GCC AAG GCA ACA CCG ATT GCT CGC GCA TTT TCC CAC TTC   542
Ile Thr Pro Ala Lys Ala Thr Pro Ile Ala Arg Ala Phe Ser His Phe
                60             65             70
GCT CTG CTG GCT AAC CTG GCG GAA GAC CTC TAC GAT GAA GAG CTT CGT   590
Ala Leu Leu Ala Asn Leu Ala Glu Asp Leu Tyr Asp Glu Glu Leu Arg
                75             80             85             90
GAA CAG GCT CTC GAT GCA GGC GAC ACC CCT CCG GAC AGC ACT CTT GAT   638
Glu Gln Ala Leu Asp Ala Gly Asp Thr Pro Pro Asp Ser Thr Leu Asp
                95             100             105
GCC ACC TGG CTG AAA CTC AAT GAG GGC AAT GTT GGC GCA GAA GCT GTG   686
Ala Thr Trp Leu Lys Leu Asn Glu Gly Asn Val Gly Ala Glu Ala Val
                110             115             120
GCC GAT GTG CTG CGC AAT GCT GAG GTG GCG CCG GTT CTG ACT GCG CAC   734
Ala Asp Val Leu Arg Asn Ala Glu Val Ala Pro Val Leu Thr Ala His
                125             130             135
CCA ACT GAG ACT CGC CGC CGC ACT GTT TTT GAT GCG CAA AAG TGG ATC   782
Pro Thr Glu Thr Arg Arg Arg Thr Val Phe Asp Ala Gln Lys Trp Ile
                140             145             150
ACC ACC CAC ATG CGT GAA CGC CAC GCT TTG CAG TCT GCG GAG CCT ACC   830
Thr Thr His Met Arg Glu Arg His Ala Leu Gln Ser Ala Glu Pro Thr
                155             160             165             170
GCT CGT ACG CAA AGC AAG TTG GAT GAG ATC GAG AAG AAC ATC CGC CGT   878
Ala Arg Thr Gln Ser Lys Leu Asp Glu Ile Glu Lys Asn Ile Arg Arg
                175             180             185
CGC ATC ACC ATT TTG TGG CAG ACC GCG TTG ATT CGT GTG GCC CGC CCA   926
Arg Ile Thr Ile Leu Trp Gln Thr Ala Leu Ile Arg Val Ala Arg Pro
                190             195             200
CGT ATC GAG GAC GAG ATC GAA GTA GCG CTG CGC TAC TAC AAG CTG AGC   974

```

53	54
Arg Ile Glu Asp Glu Ile Glu Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Lys Leu Ser	
205	210 215
CTT TTG GAA GAG ATT CCA CGT ATC AAC CGT GAT GTG GCT GTT GAG CTT	1022
Leu Leu Glu Glu Ile Pro Arg Ile Asn Arg Asp Val Ala Val Glu Leu	
220	225 230
CGT GAG CGT TTC GGC GAG GAT GTT CCT TTG AAG CCC GTG GTC AAG CCA	1070
Arg Glu Arg Phe Gly Glu Asp Val Pro Leu Lys Pro Val Val Lys Pro	
235	240 245 250
GGT TCC TGG ATT GGT GGA GAC CAC GAC GGT AAC CCT TAT GTC ACC GCG	1118
Gly Ser Trp Ile Gly Gly Asp His Asp Gly Asn Pro Tyr Val Thr Ala	
255	260 265
GAA ACA GTT GAG TAT TCC ACT CAC CGC GCT GCG GAA ACC GTG CTC AAG	1166
Glu Thr Val Glu Tyr Ser Thr His Arg Ala Ala Glu Thr Val Leu Lys	
270	275 280
TAC TAT GCA CGC CAG CTG CAT TCC CTC GAG CAT GAG CTC AGC CTG TCG	1214
Tyr Tyr Ala Arg Gln Leu His Ser Leu Glu His Glu Leu Ser Leu Ser	
285	290 295
GAC CGC ATG AAT AAG GTC ACC CCG CAG CTG CTT GCG CTG GCA GAT GCC	1262
Asp Arg Met Asn Lys Val Thr Pro Gln Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ala	
300	305 310
GGG CAC AAC GAC GTG CCA AGC CGC GTG GAT GAG CCT TAT CGA CGC GCC	1310
Gly His Asn Asp Val Pro Ser Arg Val Asp Glu Pro Tyr Arg Arg Ala	
315	320 325 330
GTC CAT GGC GTT CGC GGA CGT ATC CTC GCG ACG ACG GCC GAG CTG ATC	1358
Val His Gly Val Arg Gly Arg Ile Leu Ala Thr Thr Ala Glu Leu Ile	
335	340 345
GGC GAG GAC GCC GTT GAG GGC GTG TGG TTC AAG GTC TTT ACT CCA TAC	1406
Gly Glu Asp Ala Val Glu Gly Val Trp Phe Lys Val Phe Thr Pro Tyr	
350	355 360
GCA TCT CCG GAA GAA TTC TTA AAC GAT GCG TTG ACC ATT GAT CAT TCT	1454
Ala Ser Pro Glu Glu Phe Leu Asn Asp Ala Leu Thr Ile Asp His Ser	
365	370 375
CTG CGT GAA TCC AAT GAC GTT CTC ATT GCC GAT GAT CGT TTG TCT GTG	1502
Leu Arg Glu Ser Asn Asp Val Leu Ile Ala Asp Asp Arg Leu Ser Val	
380	385 390
CTG ATT TCT GCC ATC GAG AGC TTT GGA TTC AAC CTT TAC GCA CTG GAT	1550
Leu Ile Ser Ala Ile Glu Ser Phe Gly Phe Asn Leu Tyr Ala Leu Asp	
395	400 405 410
CTG CGC CAA AAC TCC GAA AGC TAC GAG GAC GTC CTC ACC GAG CTT TTC	1598
Leu Arg Gln Asn Ser Glu Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe	
415	420 425
GAA CGC GCC CAA GTC ACC GCA AAC TAC CGC GAG CTG TCT GAA GCA GAG	1646
Glu Arg Ala Gln Val Thr Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu	
430	435 440
AAG CTT GAG GTG CTG CTG AAG GAA CTG CGC AGC CCT CGT CCG CTG ATC	1694
Lys Leu Glu Val Leu Leu Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile	
445	450 455
CCG CAC GGT TCA GAT GAA TAC AGC GAG GTC ACC GAC GAG CTC GGC	1742
Pro His Gly Ser Asp Glu Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly	
460	465 50 470

55	56
ATC TTC CGC ACC GCG TCG GAG GCT GTT AAG AAA TTC GGG CCA CGG ATG Ile Phe Arg Thr Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met 475 480 485 490	1790
GTG CCT CAC TGC ATC ATC TCC ATG GCA TCA TCG GTC ACC GAT GTG CTC Val Pro His Cys Ile Ile Ser Met Ala Ser Ser Val Thr Asp Val Leu 495 500 505	1838
GAG CCG ATG GTA TTG CTC AAG GAA TTC GGC CTC ATT GCA GCC AAC GGC Glu Pro Met Val Leu Leu Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly 510 515 520	1886
GAC AAC CCA CGC GGC ACC GTC GAT GTC ATC CCA CTG TTC GAA ACC ATC Asp Asn Pro Arg Gly Thr Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile 525 530 535	1934
GAA GAT CTC CAG GCC GGC GCC GGA ATC CTC GAC GAA CTG TGG AAA ATT Glu Asp Leu Gln Ala Gly Ala Gly Ile Leu Asp Glu Leu Trp Lys Ile 540 545 550	1982
GAT CTT TAC CGC AAC TAC CTC CTG CAG CGC GAC AAC GTC CAG GAA GTC Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val 555 560 565 570	2030
ATG CTC GGT TAC TCC GAT TCC AAC AAG GAT GGC GGA TAT TTC TCC GCA Met Leu Gly Tyr Ser Asp Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala 575 580 585	2078
AAC TGG GCG CTT TAC GAC GCG GAA CTG CAG CTC GTC GAA CTA TGC CGA Asn Trp Ala Leu Tyr Asp Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg 590 595 600	2126
TCA GCC GGG GTC AAG CTT CGC CTG TTC CAC GGC CGT GGT GGC ACC GTC Ser Ala Gly Val Lys Leu Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val 605 610 615	2174
GGC CGC GGT GGC GGA CCT TCC TAC GAC GCG ATT CTT GCC CAG CCC AGG Gly Arg Gly Gly Gly Pro Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Arg 620 625 630	2222
GGG GCT GTC CAA GGT TCC GTG CGC ATC ACC GAG CAG GGC GAG ATC ATC Gly Ala Val Gln Gly Ser Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile 635 640 645 650	2270
TCC GCT AAG TAC GGC AAC CCC GAA ACC GCG CGC CGA AAC CTC GAA GCT Ser Ala Lys Tyr Gly Asn Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala 655 660 665	2318
CTG GTC TCA GCA ACG CTT GAG GCA TCG CTT CTC GAC GTC TCC GAA CTC Leu Val Ser Ala Thr Leu Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu 670 675 680	2366
ACC GAT CAC CAA CGC GCG TAC GAC ATC ATG AGT GAG ATC TCT GAG CTC Thr Asp His Gln Arg Ala Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu 685 690 695	2414
AGC TTG AAG AAG TAC GCC TCC TTG GTG CAC GAG GAT CAA GGC TTC ATC Ser Leu Lys Lys Tyr Ala Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile 700 705 710	2462
GAT TAC TTC ACC CAG TCC ACG CCG CTG CAG GAG ATT GGA TCC CTC AAC Asp Tyr Phe Thr Gln Ser Thr Pro Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn 715 720 725 730	2510
ATC GGA TCC AGG CCT TCC TCA CGC AAG CAG ACC TCC TCG GTG GAA GAT Ile Gly Ser Arg Pro Ser Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp	2558

Met	Thr	Asp	Phe	Leu	Arg	Asp	Asp	Ile	Arg	Phe	Leu	Gly	Gln	Ile	Leu
1				5					10					15	
Gly	Glu	Val	Ile	Ala	Glu	Gln	Glu	Gly	Gln	Glu	Val	Tyr	Glu	Leu	Val
				20				25					30		

59
 Glu Gln Ala Arg Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ala Lys Gly Asn Ala Glu
 35 40 45
 Met Asp Ser Leu Val Gln Val Phe Asp Gly Ile Thr Pro Ala Lys Ala
 50 55 60
 Thr Pro Ile Ala Arg Ala Phe Ser His Phe Ala Leu Leu Ala Asn Leu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Leu Tyr Asp Glu Glu Leu Arg Glu Gln Ala Leu Asp Ala
 85 90 95
 Gly Asp Thr Pro Pro Asp Ser Thr Leu Asp Ala Thr Trp Leu Lys Leu
 100 105 110
 Asn Glu Gly Asn Val Gly Ala Glu Ala Val Ala Asp Val Leu Arg Asn
 115 120 125
 Ala Glu Val Ala Pro Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Thr Arg Arg
 130 135 140
 Arg Thr Val Phe Asp Ala Gln Lys Trp Ile Thr Thr His Met Arg Glu
 145 150 155 160
 Arg His Ala Leu Gln Ser Ala Glu Pro Thr Ala Arg Thr Gln Ser Lys
 165 170 175
 Leu Asp Glu Ile Glu Lys Asn Ile Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Trp
 180 185 190
 Gln Thr Ala Leu Ile Arg Val Ala Arg Pro Arg Ile Glu Asp Glu Ile
 195 200 205
 Glu Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Lys Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ile Pro
 210 215 220
 Arg Ile Asn Arg Asp Val Ala Val Glu Leu Arg Glu Arg Phe Gly Glu
 225 230 235 240
 Asp Val Pro Leu Lys Pro Val Val Lys Pro Gly Ser Trp Ile Gly Gly
 245 250 255
 Asp His Asp Gly Asn Pro Tyr Val Thr Ala Glu Thr Val Glu Tyr Ser
 260 265 270
 Thr His Arg Ala Ala Glu Thr Val Leu Lys Tyr Tyr Ala Arg Gln Leu
 275 280 285
 His Ser Leu Glu His Glu Leu Ser Leu Ser Asp Arg Met Asn Lys Val
 290 295 300
 Thr Pro Gln Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ala Gly His Asn Asp Val Pro
 305 310 315 320
 Ser Arg Val Asp Glu Pro Tyr Arg Arg Ala Val His Gly Val Arg Gly
 325 330 335
 Arg Ile Leu Ala Thr Thr Ala Glu Leu Ile Gly Glu Asp Ala Val Glu
 340 345 350
 Gly Val Trp Phe Lys Val Phe Thr Pro Tyr Ala Ser Pro Glu Glu Phe
 355 360 365
 Leu Asn Asp Ala Leu Thr Ile Asp His Ser Leu Arg Glu Ser Asn Asp
 370 375 380
 Val Leu Ile Ala Asp Asp Arg Leu Ser Val Leu Ile Ser Ala Ile Glu
 385 390 395 400
 Ser Phe Gly Phe Asn Leu Tyr Ala Leu Asp Leu Arg Gln Asn Ser Glu
 405 410 415
 Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gln Val Thr
 420 425 430

61
 Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Lys Leu Glu Val Leu Leu
 435 440 445
 Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile Pro His Gly Ser Asp Glu
 450 455 460
 Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly Ile Phe Arg Thr Ala Ser
 465 470 475 480
 Glu Ala Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met Val Pro His Cys Ile Ile
 485 490 495
 Ser Met Ala Ser Ser Val Thr Asp Val Leu Glu Pro Met Val Leu Leu
 500 505 510
 Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly Asp Asn Pro Arg Gly Thr
 515 520 525
 Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile Glu Asp Leu Gln Ala Gly
 530 535 540
 Ala Gly Ile Leu Asp Glu Leu Trp Lys Ile Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr
 545 550 555 560
 Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val Met Leu Gly Tyr Ser Asp
 565 570 575
 Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala Asn Trp Ala Leu Tyr Asp
 580 585 590
 Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg Ser Ala Gly Val Lys Leu
 595 600 605
 Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Gly Pro
 610 615 620
 Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Arg Gly Ala Val Gln Gly Ser
 625 630 635 640
 Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Gly Asn
 645 650 655
 Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala Leu Val Ser Ala Thr Leu
 660 665 670
 Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu Thr Asp His Gln Arg Ala
 675 680 685
 Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Ala
 690 695 700
 Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile Asp Tyr Phe Thr Gln Ser
 705 710 715 720
 Thr Pro Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn Ile Gly Ser Arg Pro Ser
 725 730 735
 Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Ile Pro Trp
 740 745 750
 Val Leu Ser Trp Ser Gln Ser Arg Val Met Leu Pro Gly Trp Phe Gly
 755 760 765
 Val Gly Thr Ala Leu Glu Gln Trp Ile Gly Glu Gly Glu Gln Ala Thr
 770 775 780
 Gln Arg Ile Ala Glu Leu Gln Thr Leu Asn Glu Ser Trp Pro Phe Phe
 785 790 795 800
 Thr Ser Val Leu Asp Asn Met Ala Gln Val Met Ser Lys Ala Glu Leu
 805 810 815
 Arg Leu Ala Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Ile Pro Asp Arg Glu Val Ala
 820 825 830

63 64
 Glu Arg Val Tyr Ala Val Ile Arg Glu Glu Tyr Phe Leu Thr Lys Lys
 835 840 845
 Met Phe Cys Val Ile Thr Gly Ser Asp Asp Leu Leu Asp Asp Asn Pro
 850 855 860
 Leu Leu Ala Arg Ser Val Gln Arg Arg Tyr Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 865 870 875 880
 Asn Val Ile Gln Val Glu Met Met Arg Arg Tyr Arg Lys Gly Asp Gln
 885 890 895
 Ser Glu Gln Val Ser Arg Asn Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser
 900 905 910
 Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly
 915

【0111】配列番号:17

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

* トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:NO

*

配列

CGCGAGGTAC CACCTGTCAC

20

【0112】配列番号:18

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

※ トポロジー:直鎖状

20 配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

※

CAATCCAGGT ACCGGCAACC

20

【0113】配列番号:19

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

★ トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:NO

★

配列

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA

23

【0114】配列番号:20

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

☆ トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

☆

配列

CGGTTTCATCG CCAAGTTTTT CTT

23

【0115】配列番号:21

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

◆ トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:NO

◆

配列

GTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC

23

【0116】配列番号:22

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

配列

GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG

23

【0117】配列番号:23

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

50 配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:NO

CATCTAAGTA TGCATCTCGG

【0118】配列番号:24

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列

TGCCCCCTCGA GCTAAATTAG

【図面の簡単な説明】

【図1】 変異型lysCを有するプラスミドp399AK9B及びp399AKYB構築の過程を示す図。

【図2】 lysAを有するプラスミドp299LYSAの構築の過程を示す図。

【図3】 lysA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpLYSABの構築の過程を示す図。

【図4】 PEP C構造遺伝子を含むプラスミドpAKPFdsの構築の過程を示す図。

【図5】 新規なコリネ型細菌用クローニングベクターpVK6及びpVK7の構築の過程を示す図。

【図6】 野生型高発現型ppcを含むプラスミドpPwmの構築の過程を示す図。

【図7】 変異型lysC、lysA及びBrevi.-oriを有するプ※

* トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

*

20

20

※ラスミドpCLの構築の過程を示す図。

【図8】 dapA及びBrevi.-oriを有するプラスミドpDPSBの構築の過程を示す図。

【図9】 dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpDPRBの構築の過程を示す図。

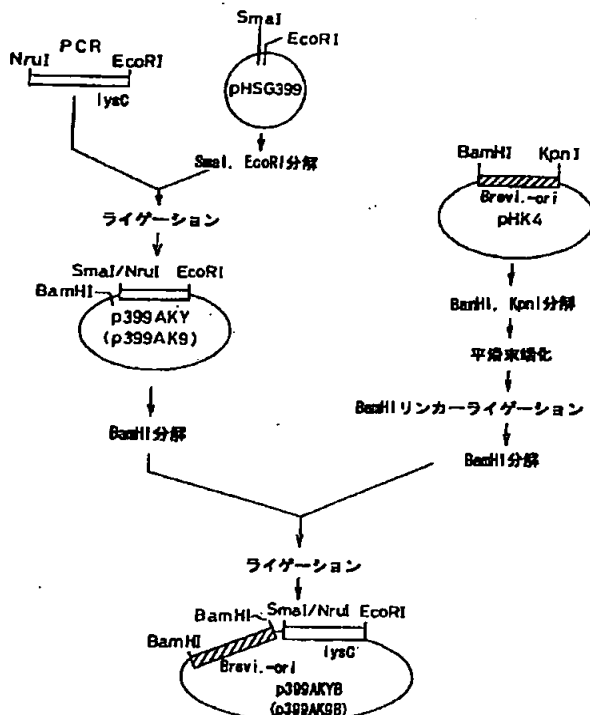
【図10】 ddh及びBrevi.-oriを有するプラスミドpPK4Dの構築の過程を示す図。

【図11】 lysC、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCRCABの構築の過程を示す図。

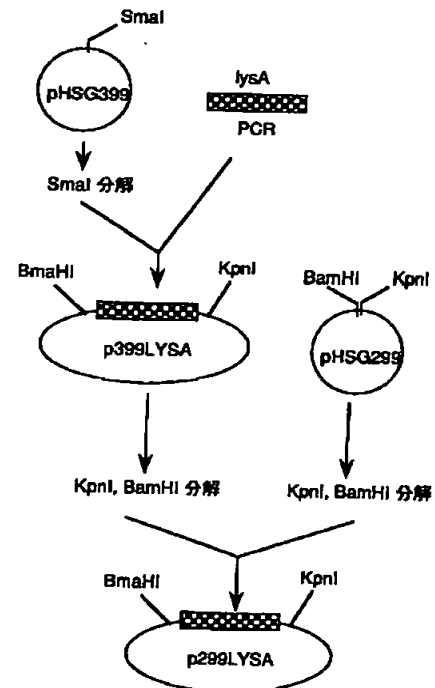
【図12】 変異型lysC、dapB及びBrevi.-oriを有するプラスミドpCBの構築の過程を示す図。

【図13】 変異型lysC及びddhを有するプラスミドpCDの構築の過程を示す図。

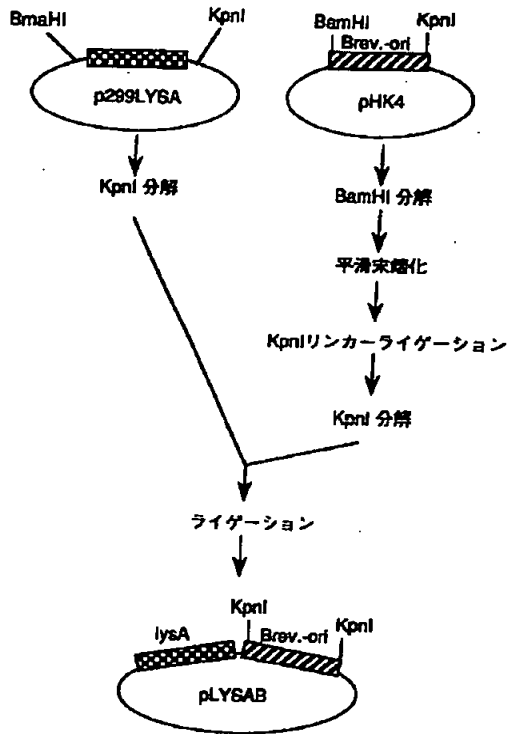
【図1】



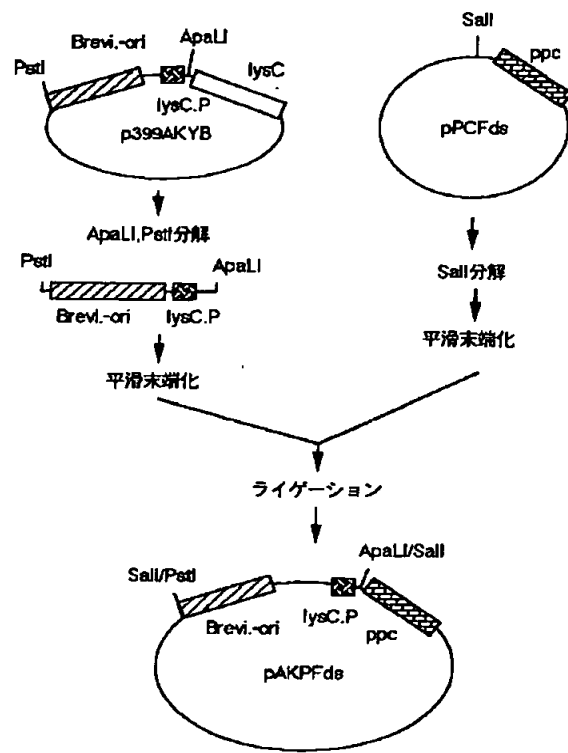
【図2】



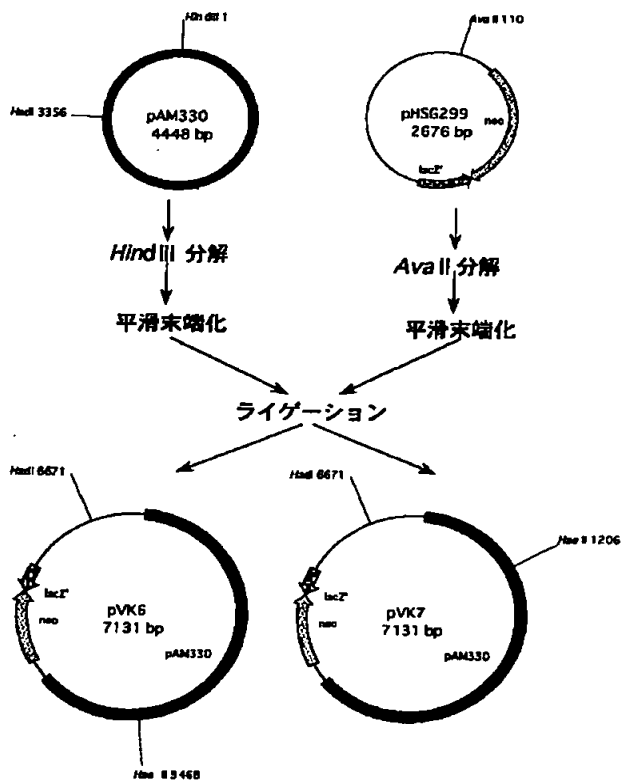
【図3】



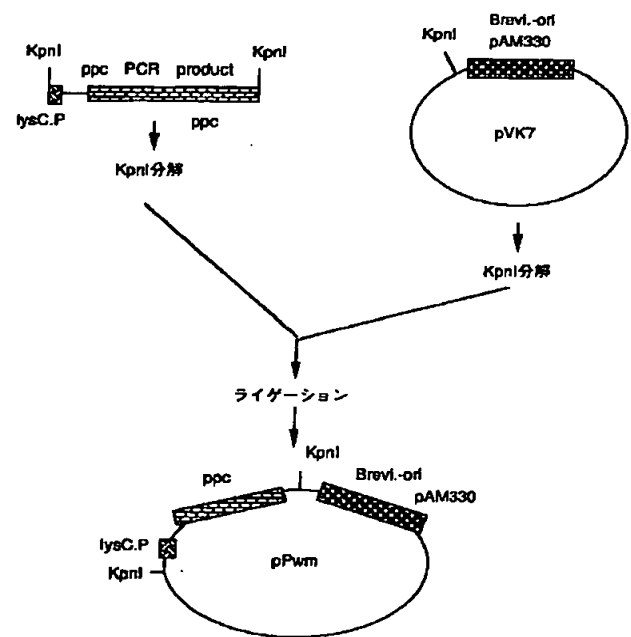
【図4】



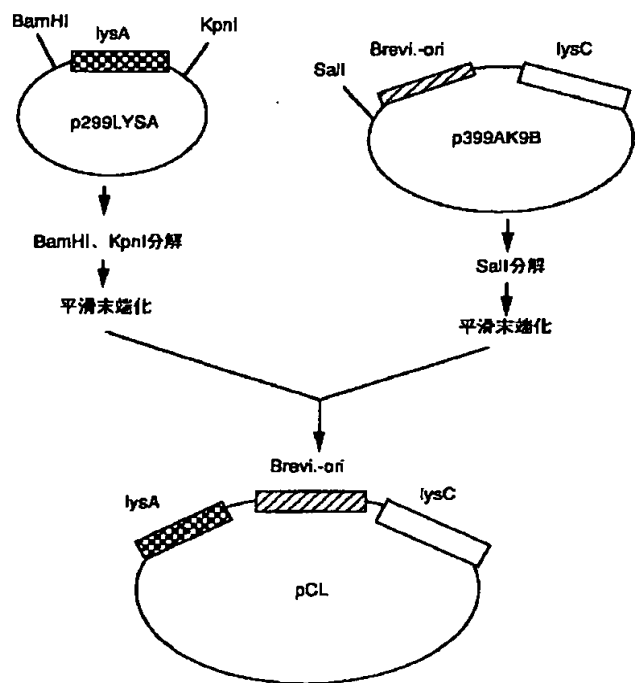
【図5】



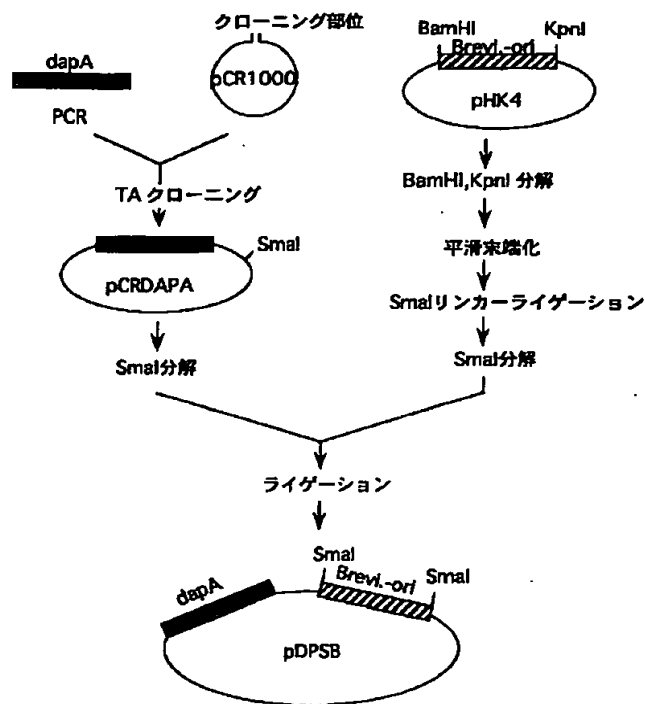
【図6】



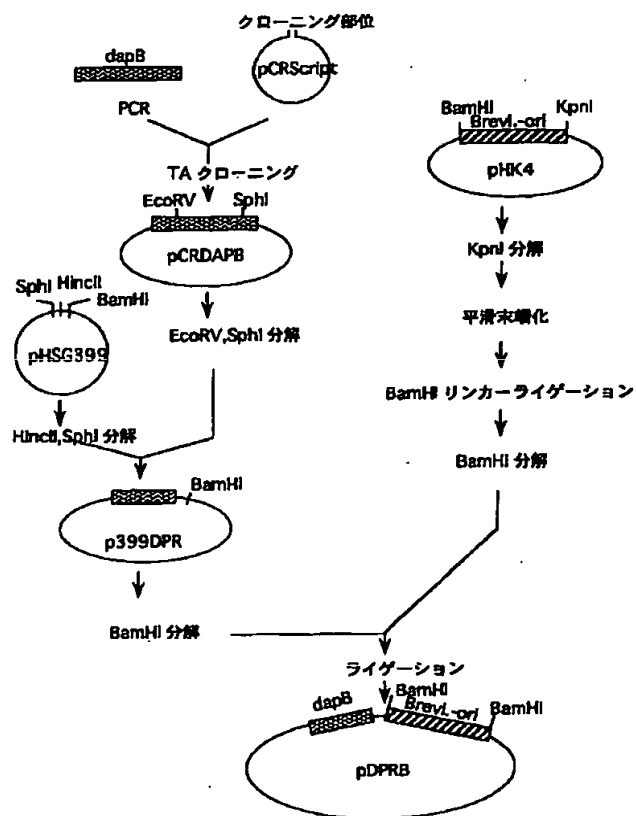
【図7】



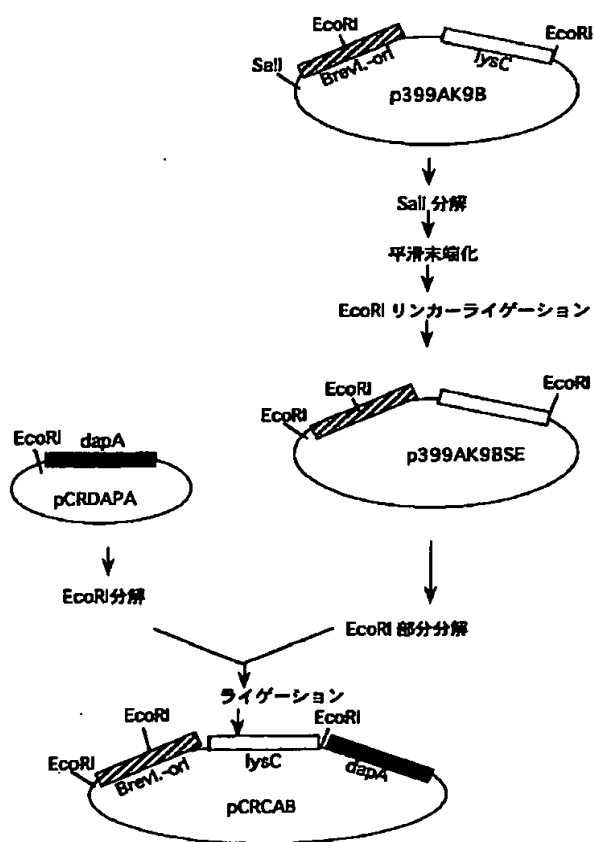
【図8】



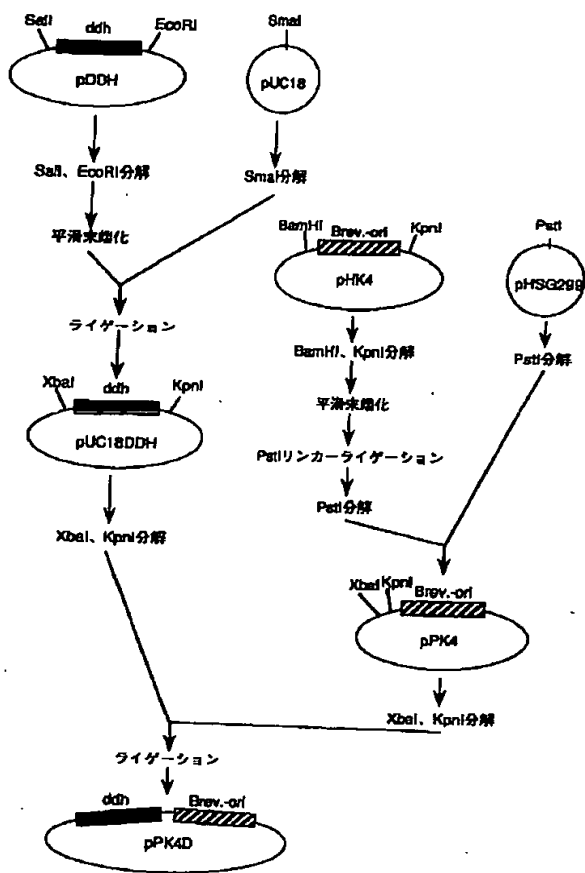
【図9】



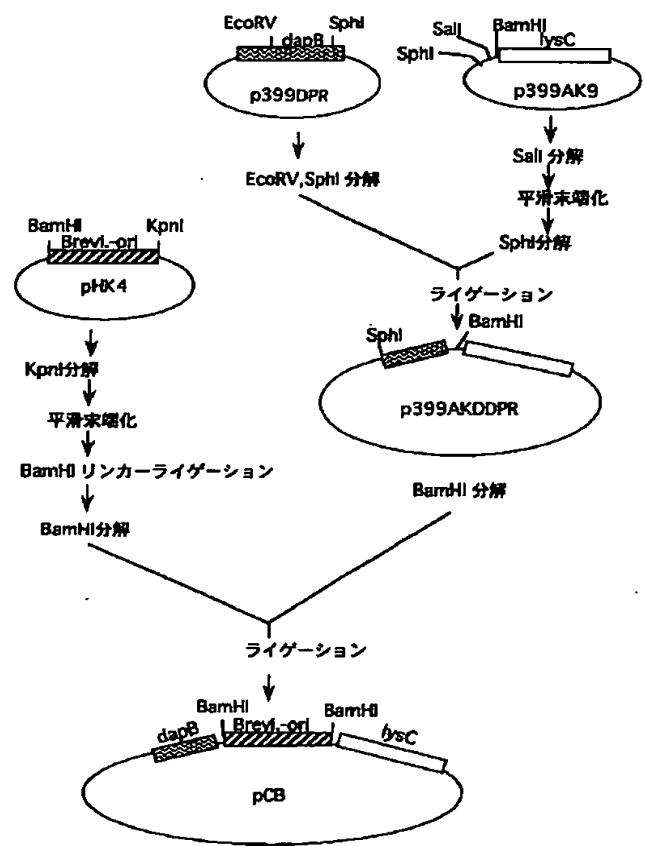
【図11】



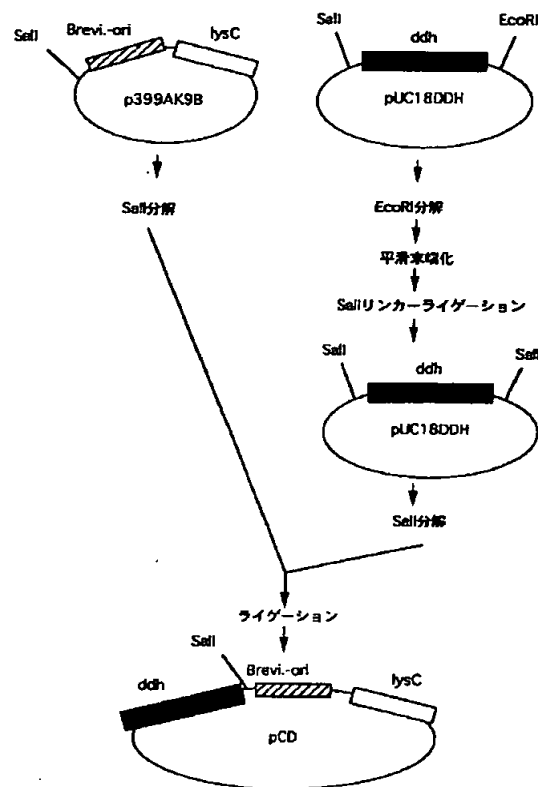
【図10】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F I

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:15)

(72) 発明者 中松 亘

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社生産技術研究所内